

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

INGRYD FORTES SOUZA LIPAUS

**EFEITOS COMPORTAMENTAIS E NEUROTÓXICOS DA INALAÇÃO
DIRETA DE *CRACK* EM RATOS**

VITÓRIA
2017

INGRYD FORTES SOUZA LIPAUS

**EFEITOS COMPORTAMENTAIS E NEUROTÓXICOS DA INALAÇÃO
DIRETA DE *CRACK* EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Lívia Carla de Melo Rodrigues

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Ester Miyuki Nakamura Palacios

VITÓRIA

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

REGISTRO DE JULGAMENTO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Aprovado em ____ de ____ de ____.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª Drª Lívia Carla de Melo Rodrigues

Profª Drª Ester Miyuki Nakamura Palacios

Profª. Drª. Sônia Alves Gouvêa

Profª. Drª. Patrícia Fernanda Schuck

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

Vitória, Julho de 2017

Lipaus, Ingryd Fortes Souza, 1993.

Efeitos comportamentais e neurotóxicos da inalação direta de *crack* em ratos [Vitória] 2017

xvi, 78 p., 29,7 cm (UFES, M. Sc., Ciências Fisiológicas, 2017)

Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo.

*A Deus pelo fôlego de vida.
Ao meu esposo Rômulo por todo apoio e amor.*

“Grandes são as obras do SENHOR, dignas de estudo para quem as ama.” Salmos 111:2

AGRADECIMENTOS

A Deus, sem Ele não teria conseguido. “Tu és o meu Deus; graças te darei! Ó meu Deus, eu te exaltarei!” (Salmos 118:28).

Ao meu esposo Rômulo, que com todo carinho me apoiou e me deu forças para continuar essa caminhada. Obrigada meu amor pelas sábias palavras nos momentos mais difíceis!

Aos meus pais, Jackson e Marly, que sempre me incentivaram e nunca mediram esforços para que hoje eu pudesse chegar aqui. Aos meus irmãos, Rackel e Jackson Jr., amo vocês.

À minha Orientadora, Prof.^a Dr.^a Livia Carla, por ter me acolhido como sua aluna, me auxiliando ao longo dessa caminhada. Obrigada pela sua confiança e por acreditar em mim.

À minha Co-orientadora, Prof.^a Dr.^a Ester Miyuki, que me honrou com sua participação e auxílio no trabalho. Agradeço seus esforços para conseguir a liberação da droga e assim tornar possível a realização deste trabalho.

As minhas amigas, Elisa Fraga e Cleciane Waldetário, que me ajudaram desde o início da caminhada. Levarei nossa amizade por toda vida, o grupo “Masters” não pode parar! Obrigada Elisa, minha gêmea siamesa, o experimento dando certo ou errado estávamos sempre juntas. Obrigada Cléo, por todos os conselhos e pela paciência em ensinar os testes comportamentais e a como cuidar de tudo no laboratório.

Aos amigos do laboratório LCCNPF e LANEP, Jozué (o técnico e rei da “gambiarra”), Lucas, Andrezza e todos os IC’s que me acompanharam e me ajudaram com os experimentos. Aos amigos de outros laboratórios: Marcos, que sempre esteve disposto para ajudar e tirar as dúvidas; Jean, pela paciência e disponibilidade em ensinar a técnica de AOPP; e aos alunos do laboratório de Imunobiologia, por

possibilitar o uso do leitor de placas. Ao técnico Anderson, pela paciência e prontidão em ajudar. Ao técnico Leduc do NDI, por disponibilizar o nitrogênio líquido.

À Polícia Civil do Estado do Espírito Santo, pela viabilização da droga. E ao Departamento Médico Legal da Superintendência de Polícia técnica do Espírito Santo, pela realização das dosagens no sangue, especialmente ao Evandro Lebach e a Josidéia Mendonça.

As professoras Dr.^a Ana Paula Bittencourt e Dr.^a Sônia Alves, por participarem da minha banca de qualificação e por fazerem comentários relevantes para essa pesquisa.

À Prof.^a Dr.^a Patrícia Schuck, por ter cedido seu laboratório na UNESC para realizar as análises bioquímicas. À Mestra Fernanda Malgarin por ter aberto as portas da sua casa para me receber e por sua paciência ao realizar e ensinar as técnicas de estresse oxidativo.

À Igreja Cristã Filadélfia, a qual eu congregar e que busca através do Instituto Neemias recuperar dependentes químicos e resgatar valores através da transformação do caráter.

Aos animais de laboratório, meu agradecimento e respeito por toda contribuição à ciência.

Ao CNPq por proporcionar suporte financeiro e a CAPES pela concessão da bolsa para a realização deste trabalho.

E a todos que participaram de forma direta ou indireta para a concretização desse sonho, meu agradecimento.

SUMÁRIO

RESUMO.....	I
ABSTRACT.....	II
LISTA DE FIGURAS.....	III
LISTA DE TABELAS.....	V
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VI
1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 CRACK: CONCEITO E HISTÓRICO.....	17
1.2 COCAÍNA E O SISTEMA DE RECOMPENSA CEREBRAL.....	21
1.3 O CÓRTEX PRÉ-FRONTAL E A MEMÓRIA OPERACIONAL.....	25
1.4 ESTRESSE OXIDATIVO.....	27
1.4.1 Sistema de Defesa Antioxidante.....	31
1.4.2 Neurotoxicidade da cocaína/crack.....	32
2 OBJETIVOS.....	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
3.1 ANIMAIS.....	35
3.2 DROGA.....	35
3.3 EXPERIMENTO COMPORTAMENTAL.....	36
3.3.1 Aquisição de Tarefa.....	37
3.4 INALAÇÃO DIRETA DE CRACK.....	40
3.4.1 Eutanásia e dosagem de AEME, cocaína e seus metabólitos.....	43
3.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	43
3.5.1 Preparo das amostras e quantificação de proteína.....	43
3.5.2 Determinação dos Produtos Avançados de Oxidação Proteica (AOPP)	44
3.5.3 Ensaio de Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS).....	44
3.5.4 Atividade da enzima Catalase (CAT).....	45
3.5.5 Atividade da enzima Glutathione Peroxidase (GPx).....	45

3.5.6 Atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD)	45
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
4 RESULTADOS	48
4.1 ANÁLISE DOS PESOS CORPORAIS	48
4.2 EXPERIMENTO COMPORTAMENTAL.....	49
4.2.1 Aquisição de tarefa – antes da introdução do retardo de 5 segundos	49
4.2.2 Aquisição de tarefa – após a introdução do retardo de 5 segundos ..	51
4.3 DESEMPENHO COMPORTAMENTAL (RETARDO 1 HORA)	52
4.4 QUANTIFICAÇÃO DE AEME, COCAÍNA E SEUS METABÓLITOS.....	54
4.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	54
4.5.1 Determinação dos Produtos Avançados de Oxidação Proteica (AOPP)	54
4.5.2 Ensaio de Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS)	55
4.5.3 Atividade das enzimas antioxidantes: Catalase (CAT), Glutathione Peroxidase (GPx) e Superóxido Dismutase (SOD)	55
5 DISCUSSÃO	57
6 CONCLUSÕES	66
REFERÊNCIAS	67

RESUMO

A cocaína é um alcaloide com propriedades psicoestimulantes presentes na planta *Erythroxylum coca*. Uma de suas principais formas de consumo é em sua apresentação com base alcalina e altamente tóxica, o *crack*. De fato, é uma droga bastante potente, com uma euforia que ocorre poucos segundos após sua inalação, e tornou-se um importante problema de saúde pública. Seu consumo tem sido associado a descontrole na tomada de decisões, violência e problemas psiquiátricos. O objetivo desse estudo foi investigar os efeitos da inalação direta de *crack* sobre a memória operacional espacial e parâmetros de estresse oxidativo. Para tanto, ratos Wistar machos, previamente treinados no labirinto radial de oito braços (LR-8) foram submetidos a cinco sessões diárias de 3 g de *crack* (CK) ou inalação simulada (*sham*) e avaliados em testes com retardo de 1 h no LR-8. Ao final do protocolo comportamental os animais foram eutanasiados, seu córtex pré-frontal, hipocampo e estriado foram removidos para a análise de parâmetros de estresse oxidativo através da avaliação da peroxidação lipídica (TBA-RS), produtos avançados de oxidação proteica (AOPP) e atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). Animais que foram submetidos à inalação direta de *crack* apresentaram maior número de erros em tarefa com retardo de 1 h no LR-8 quando comparado ao grupo *sham* ($p < 0,01$). Animais do grupo CK também apresentaram uma redução significativa ($p < 0,05$) na peroxidação lipídica, no hipocampo, aumento ($p < 0,05$) na atividade da SOD e aumento ($p < 0,001$) nos níveis de AOPP comparados ao grupo *sham*, no estriado. As principais conclusões deste estudo apontam que a inalação direta de *crack* por cinco dias causa prejuízos de memória operacional espacial de duração prolongada e altera parâmetros de estresse oxidativo em regiões envolvidas no circuito de gratificação cerebral.

Palavras chaves: memória operacional, labirinto radial, crack, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Cocaine is an alkaloid psychostimulant found in the *Erythroxylon Coca* plant. Nowadays, one of its main consumption form is the alkaline base, crack-cocaine, which is highly toxic. It is a very potent drug, with euphoric effect occurring within seconds of its inhalation, and has become a serious public health problem in our country. Its consumption has been associated with uncontrolled decision making, with violence and psychiatric outbursts by consequences. This study examined the effects of the direct crack-cocaine inhalation on spatial working memory and oxidative stress parameters in rats. Thus, male Wistar rats previously trained in the 8-arm radial maze (8-RM) delayed procedure were randomly distributed to receive five daily sessions of 3 g of crack-cocaine (CK group) or inhaling simulation (*sham* group) and were evaluated in 1-h delayed task in the 8-RM 24 hours after the last inhalation. After further 24-h from the behavioral protocol the animals were euthanized and had their prefrontal cortex, hippocampus and striatum removed for the analysis of oxidative stress parameters through the evaluation of lipid peroxidation (TBA-RS), advanced oxidation protein products (AOPP) and activity of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx). Animals from CK group presented increased number of errors in 1-h delayed tasks in 8-RM when compared to *sham* group ($p < 0.01$). These animals (CK group) also showed a significant ($p < 0.05$) decrease in lipid peroxidation in the hippocampus, increased ($p < 0.05$) in activity of SOD and increased ($p < 0.001$) levels of AOPP in the striatum compared to the *sham* group. These results showed that the direct crack-cocaine inhalation for five days impaired long-termed spatial working memory and changed parameters of oxidative stress in hippocampus and striatum, which are regions involved in the cerebral rewarding system.

Keywords: working memory, radial maze, crack-cocaine, oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cocaína (estrutura química).....	17
Figura 2. Planta <i>Erythroxylum coca</i>	18
Figura 3. Fluoxograma do método de obtenção do cloridrato de cocaína e do <i>crack</i> a partir de folhas da planta do gênero <i>Erythroxylum</i>	19
Figura 4. Amostra de pedra de <i>crack</i> apreendida pela Delegacia de Entorpecentes da Polícia Civil do Espírito Santo e utilizada nos experimentos.	19
Figura 5. Reação de pirólise ou decomposição térmica da cocaína formando anidroecgonina metil éster (AEME).....	21
Figura 6. Cocaína bloqueia o transportador de dopamina.....	22
Figura 7. Circuito de recompensa cerebral no cérebro de roedores.....	23
Figura 8. Reação utilizada para detecção de malondialdeído (MDA).....	29
Figura 9. Mecanismos postulados de oxidação de proteínas in vivo.....	30
Figura 10. Reações de antioxidantes.	32
Figura 11. Vias de produção e liberação de ERO.	32
Figura 12. Labirinto Radial de oito braços (LR-8).....	37
Figura 13. Animal que encontrou o reforço no receptáculo.....	38
Figura 14. Labirinto Radial de oito braços (LR-8) - Desenho esquemático da fase V representando o pré e pós-retardo.....	40
Figura 15. Aparato de inalação de <i>crack</i> utilizado no estudo: Animal que recebeu inalação direta de <i>crack</i>	41
Figura 16. Aparato para simulação de inalação: Animal <i>sham</i>	42
Figura 17. Diagrama do protocolo experimental.....	42
Figura 18. Média dos pesos corporais (g) \pm e.p.m. dos animais nas fases de treinamento (n = 25). ** p < 0,01, *** p < 0,0001 comparado ao peso inicial pela ANOVA de uma via para medidas repetidas com <i>post-hoc</i> de Tukey.....	48
Figura 19. Média de erros \pm e.p.m. nas 10 últimas sessões de treinamento na fase IV (aprendizagem) no LR-8 (n = 25). +++ p < 0,0001 (Análise de regressão linear). *** p < 0,0001 comparada às sessões 1, 2 e 6 (ANOVA de uma via para medidas repetidas, seguida do Teste de Tukey).	50
Figura 20. Média de erros \pm e.p.m. dos animais antes (pré-retardo) e após (pós-retardo) o retardo de 5 segundos nas sessões de treinamento da fase V para aquisição das tarefas no LR-8 (n = 25). +++ p < 0,05 (Análise de regressão linear) ***	

$p < 0,0001$ comparada com as sessões 1,2 e 3 (ANOVA de 1 via para medidas repetidas, seguida do Teste de Tukey).51

Figura 21. Efeito da inalação de *crack* (CK, $n = 13$) e da simulação (*sham*, $n = 12$), sobre o desempenho (média de erros \pm e.p.m.) antes (pré-retardo) e após (pós-retardo) os retardo de 1 hora de animais desempenhando tarefas no LR-8. ** $p < 0.01$ comparado ao grupo *sham* (teste *t* de Student)53

Figura 22. Efeito da inalação de *crack* sobre os níveis de produtos avançados de oxidação proteica (AOPP) no córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HPC) e estriado (EST) de ratos dos grupos *sham* e *crack* (CK) ($n = 7$ por grupo). Os dados expressos em $\mu\text{mol} / \text{mg}$ de proteína (média \pm e.p.m.). *** $p < 0,001$ comparado ao grupo *sham* (teste *t* de Student).54

Figura 23. Efeito da inalação de *crack* sobre os níveis das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) no córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HPC) e estriado (EST) de ratos dos grupos *sham* e *crack* (CK) ($n = 7$ por grupo). Os dados expressos em nmol / mg de proteína (média \pm e.p.m.). * $p < 0,05$ comparado ao grupo *sham* (teste *t* de Student).55

Figura 24. Atividade das enzimas (média \pm e.p.m.) Catalase (A), Glutathione Peroxidase (B) e Superóxido Dismutase (C) no córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HPC) e estriado (EST) de ratos dos grupos *sham* e *crack* (CK) ($n = 5-6$ por grupo). Os dados expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína (média \pm e.p.m.). * $p < 0,05$ comparado ao grupo *sham* (teste *t* de Student).56

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Média do tempo gasto (segundos) \pm e.p.m em cada braço visitado nas 10 últimas sessões de treinamento na fase IV (aprendizagem) no LR-8 (n = 25).....50
- Tabela 2.** Média do tempo gasto (segundos) \pm e.p.m. pelos animais em cada braço visitado no pré e pós-retardo de 5 segundos nas últimas seis sessões de treinamento na fase V (n = 25).....52
- Tabela 3.** Média do tempo gasto (segundos) \pm e.p.m. em cada braço visitado pelos animais submetidos à inalação do *crack* (CK, n = 13) ou inalação simulada (*Sham*, n = 12) antes (pré-retardo) e após (pós-retardo) o retardo de 1 hora no LR-8.....53

LISTA DE ABREVIATURAS

AEME	Anidroecgonina Metil Éster
AOPP	Produtos Avançados de Oxidação Proteica
ATV	Área Tegmentar Ventral
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
CAT	Catalase
CPF	Córtex pré-frontal
DA	Dopamina
DOPAC	Ácido 3,4-di-hidroxifenilacético
EMA	Éster metil anidroecgonina
ERO	Espécies reativas de oxigênio
EST	Estriado
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplado a espectro de massa
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione Reduzida
GSR	Glutathione Redutase
GSSG	Glutathione Oxidada
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HPC	Hipocampo
LANEP	Laboratório de Neurotoxicologia e Psicofarmacologia
LCCNPF	Laboratório de Ciências Cognitivas e Neuropsicofarmacologia
LR-8	Labirinto Radial de oito braços
MDA	Malondialdeído
MEG	Metilecgonidina
NAc	Núcleo Accumbens
NADPH	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina fosfato reduzida

$O_2^{\cdot-}$	Superóxido
$ONOO^-$	Peroxinitrito
SOD	Superóxido Dismutase
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBA-RS	Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

1 INTRODUÇÃO

1.1 CRACK: CONCEITO E HISTÓRICO

O uso de substâncias psicoativas para fins recreativos sempre esteve presente na história da humanidade, sendo muitas delas de uso lícito, como o tabaco e o álcool. Entretanto, um número crescente de drogas de abuso de origem ilícita vem se tornando cada vez mais difundido entre a população, o que leva a altos índices de violência e morte entre os usuários (UNODC, 2015). Entre as drogas que levam a diversos problemas sociais, a cocaína surge como uma substância com elevado potencial de consumo de risco (BYSTROWSKA et al., 2014).

A cocaína (Figura 1) é um alcaloide com propriedades psicoestimulantes, extraído das folhas da planta *Erythroxylum coca* (Figura 2). Desta obtém-se o cloridrato de cocaína. Um pó branco facilmente solúvel em água e comumente administrado por via nasal ou intravenosa. Devido ao seu alto ponto de fusão (196°C, sofrendo decomposição a essa temperatura) essa forma não pode ser fumada (CHASIN et al., 2008).

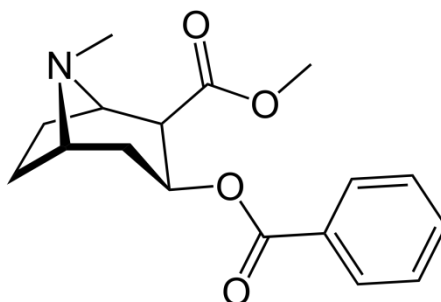


Figura 1. Cocaína (estrutura química). Fonte: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Coca%C3%ADna>



Figura 2. Planta *Erythroxylum coca*. Fonte: <http://www.prota4u.org/protav8.asp?en=1&p=Erythroxylum+coca>

O *crack* é a cocaína na sua forma de base livre que tem um ponto de fusão mais baixo (96-98°C) resultante da adição de substâncias básicas (bicarbonato de sódio, principalmente) e impurezas (querosene, gesso) ao cloridrato de cocaína, se tornando de cinco a sete vezes mais potente do que a cocaína em pó (Figura 3) (GARCIA et al., 2012; KESSLER; PECHANSKY, 2008). Após o aquecimento dessa mistura a parte sólida separa-se da líquida; da parte sólida obtém-se um resíduo seco, vendido na forma de pequenas pedras (Figura 4), fumadas em cachimbos, cigarros ou objetos improvisados (GARCIA, 2009; KESSLER; PECHANSKY, 2008). O nome *crack* provém do barulho produzido pela queima das pedras (KESSLER; PECHANSKY, 2008).

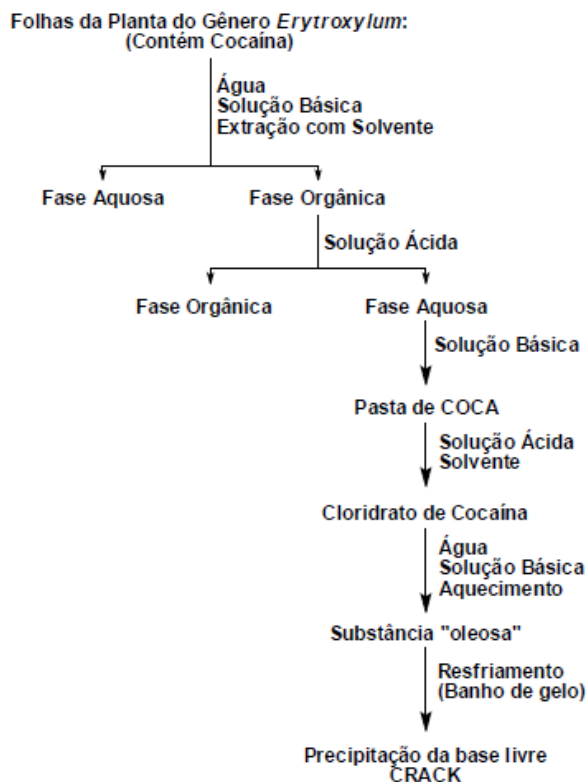


Figura 3. Fluxograma do método de obtenção do cloridrato de cocaína e do *crack* a partir de folhas da planta do gênero *Erytroxylum*. Fonte: Retirado de Garcia (2009).



Figura 4. Amostra de pedra de *crack* apreendida pela Delegacia de Entorpecentes da Polícia Civil do Espírito Santo e utilizada nos experimentos. Fonte: Acervo pessoal.

Quando fumado, o *crack* produz partículas que são absorvidas rapidamente pelos pulmões, conduzindo imediatamente ao aparecimento dos efeitos estimulantes da cocaína. De fato, é uma droga bastante potente, com uma euforia que ocorre poucos segundos após a inalação (GARCIA, 2009). A curta duração dos efeitos faz com que o usuário volte a utilizar a droga com mais frequência comparada às outras formas de consumo. Os usuários descrevem uma “fissura” (craving, em inglês) quase incontrolável quando a estavam utilizando (GARCIA, 2009; KESSLER;

PECHANISKY, 2008), como consequência isso pode levar ao desenvolvimento de dependência muito mais rapidamente do que a cocaína em suas outras formas de consumo (CARLINI; NAPPO; NOTO, 2001).

O *crack* teve a sua origem nos bairros pobres de Nova Iorque, Los Angeles e Miami na década de 80. A droga atraía usuários que não tinham condições de pagar pela cocaína em pó, que era mais cara do que o *crack*. No final da década de 90, surgiram os primeiros relatos sobre o consumo do *crack* no Brasil, entre indivíduos em situação de rua da cidade de São Paulo e 20 anos depois já se disseminou por todas as regiões do Brasil, com um crescimento não somente na capital como também em municípios de pequeno porte, tornando-se uma epidemia no país (DUNN et al., 1996; NAPPO; GALDURÓZ; NOTO, 1994; SANTOS, 2011).

A cocaína e o *crack*, juntamente com a maconha, são hoje as drogas ilícitas mais utilizadas no Brasil e no mundo e vêm chamando atenção das autoridades pelos altos números de homicídios e doenças sexualmente transmissíveis relacionados ao consumo dessas substâncias (CARLINI; GALDURÓZ, 2006; CARLINI et al., 2002). O Brasil foi apontado como uma das nações emergentes onde o consumo de estimulantes como a cocaína – seja na forma intranasal ou fumada – está aumentando enquanto na maioria dos países o consumo está diminuindo (LARANJEIRA; MADRUGA, 2014). Esses dados demonstram o crescimento do número de usuários no Brasil, gerando uma apreensão na sociedade, uma vez que a fragilidade gerada pelo uso do *crack* está associada a inúmeros problemas de ordem física, psiquiátrica e social, podendo levar ao fenômeno da dependência, doenças pulmonares, isolamento social, violência, desemprego, indicando assim que a dependência de *crack* é um importante problema social.

Durante a queima do *crack*, o aquecimento da cocaína gera um produto denominado anidroecgonina metil éster (AEME) (Figura 5), também conhecido como metilecgonidina (MEG) ou éster metil anidroecgonina (EMA). Esse composto é proveniente da decomposição térmica da cocaína e é considerado, portanto, um marcador analítico do uso recente do *crack* por via inalatória (GARCIA, 2009; TOENNES et al., 2003) e sua detecção no cabelo, pode evidenciar exposições anteriores ou ainda um usuário crônico (GARCIA, 2014). O usuário que fuma *crack*

fica exposto, além da cocaína, aos efeitos desse produto. Garcia et al., (2012) mostraram que a AEME é ainda mais tóxica do que a cocaína em culturas de células primárias do hipocampo de ratos. Além disso, quando a AEME e a cocaína foram associadas, houve um efeito aditivo, sugerindo um maior risco com o uso do *crack* em comparação ao uso da cocaína em pó.

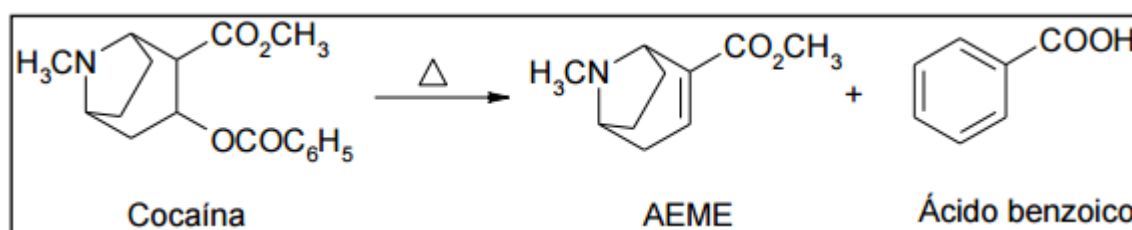


Figura 5. Reação de pirólise ou decomposição térmica da cocaína formando anidroecgonina metil éster (AEME). Fonte: Retirado de Garcia (2009).

A cocaína, uma vez absorvida, atinge rapidamente o cérebro e ativa o sistema de recompensa cerebral, essencialmente dopaminérgico (RITZ; CONE; KUHAR, 1990).

1.2 COCAÍNA E O SISTEMA DE RECOMPENSA CEREBRAL

Psicoestimulantes, incluindo a cocaína, agem diretamente sobre os terminais pré-sinápticos dos axônios aferentes de liberação na área tegmentar ventral (ATV). A cocaína inibe a recaptação de dopamina (DA) da fenda sináptica através do bloqueio de transportadores de monoamina (Figura 6), levando ao aumento de DA no circuito de gratificação e causando os sintomas clássicos de euforia e agitação associados à utilização da droga. Acredita-se que esse aumento leva aos efeitos de recompensa causados pela droga (GOLDSTEIN; VOLKOW, 2011; HYMAN; MALENKA, 2001; SULZER et al., 2005).

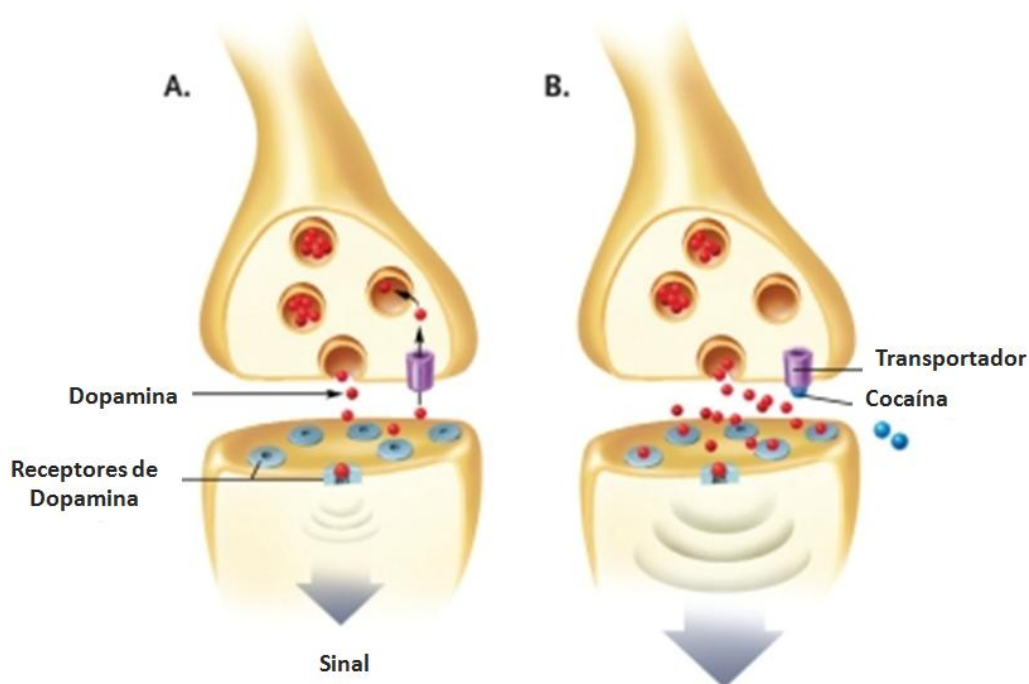


Figura 6. Cocaína bloqueia o transportador de dopamina. Nesta ilustração baseada em estudos com PET (sigla em inglês para tomografia por emissão positrônica), a cocaína bloqueia o transportador de dopamina, impedindo sua recaptação para a célula pré-sináptica. Como resultado, moléculas de dopamina se acumulam no espaço intercelular sobrecarregando os receptores da célula que recebe o sinal, intensificando a resposta nesta célula. Fonte: Adaptado de Fowler et al., (2007).

Drogas de abuso alteram o circuito de recompensa natural (Figura 7), evolutivamente otimizado para a sobrevivência (DILEONE; TAYLOR; PICCIOTTO, 2012). As vias da ATV e núcleo accumbens (NAc) são apenas uma parte do circuito de recompensa, que envolve várias outras regiões importantes do cérebro como o córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HPC), estriado (EST) e amígdala basolateral (JOFFE; GRUETER; GRUETER, 2014). Essas regiões reunidas desempenham um papel crítico na adaptação e realização de comportamentos que envolvem a recompensa cerebral (HYMAN; MALENKA, 2001). Esse circuito está envolvido na modulação das respostas que envolvem uma recompensa, regulando as respostas a reforçadores naturais envolvidos com a sobrevivência e reprodução, tais como alimento, bebida, sexo, interação social e, ainda, qualquer estímulo que gere uma sensação de prazer (NESTLER; LANDSMAN, 2001).

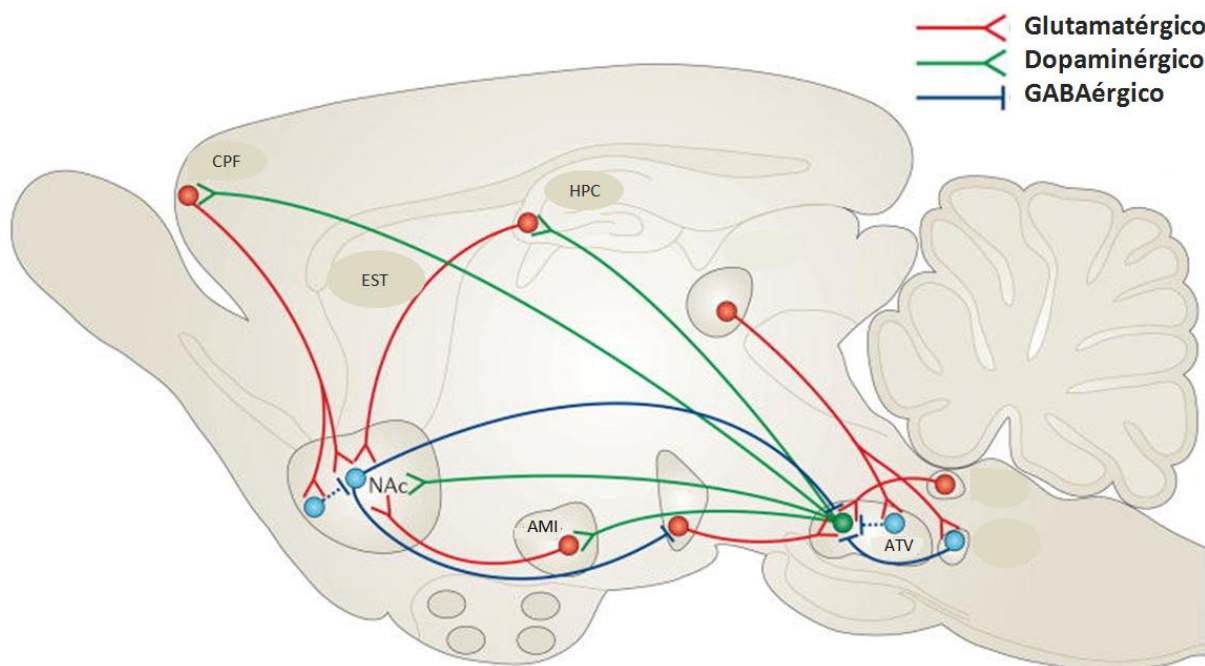


Figura 7. Circuito de recompensa cerebral no cérebro de roedores. Um esquema simplificado das principais conexões dopaminérgicas, glutamatergicas e GABAérgicas com a área tegmental ventral (ATV) e o núcleo accumbens (NAc) (Dopaminérgico = verde, glutamatergico = vermelho e GABAérgico = azul). CPF, córtex pré-frontal; EST, estriado; HPC, hipocampo; AMI, amígdala. Fonte: Adaptado de Russo e Nestler (2014).

As drogas de abuso produzem mudanças duradouras no sistema nervoso central, alterando sua função e induzem efeitos através de diferentes mecanismos; todas recrutam as vias de recompensa do sistema nervoso central, o sistema dopaminérgico mesocorticolímbico. A ação principal das substâncias de abuso é facilitar, direta ou indiretamente a liberação do neurotransmissor DA, produzida na ATV do mesencéfalo (DI CHIARA et al., 2004). Dessa forma, a modulação do sistema dopaminérgico por drogas como a cocaína e o *crack* se apresenta como um importante foco para o estudo de alterações cognitivas, tais como déficits em processos de aprendizagem e memória.

O CPF, representado pela porção anterior dos lobos frontais, é mais associado com a função executiva, que é um termo genérico para os processos de ordem superior, tais como planejamento e premeditação, resolução de problemas e flexibilidade cognitiva (GOLDSTEIN; VOLKOW, 2011). Estímulos gratificadores ativam o CPF, o que é fortemente influenciada pela previsibilidade da recompensa, em parte, pela liberação de DA do cérebro, por outro lado um CPF hipoativo tem sido associado

com a perda de controle sobre a procura de drogas de abuso que se observa em indivíduos dependentes (CHEN et al., 2013).

A liberação de DA no NAc e CPF ocorre quando um determinado estímulo gera uma sensação de prazer; esse estímulo pode ser desde o cheiro de um alimento, quando estamos com fome, ou um estímulo químico, como acontece no uso de drogas psicoativas (HYMAN; MALENKA, 2001). A fissura que ocorre nos usuários de drogas mostra que a procura e obtenção de drogas pode estar relacionada com a capacidade das drogas de abuso de alterar esse circuito de recompensa natural e comprometer a motivação e a condução do indivíduo por reforços naturais. Dessa forma, quanto maior a capacidade que uma droga possua de produzir dependência, maiores serão os esforços do usuário para consegui-la novamente (NESTLER; LANDSMAN, 2001). Além do CPF, outra estrutura que está envolvida no sistema de recompensa cerebral, e que possui um papel chave nos processos de aprendizagem e memória, é o HPC (ROSSA, 2012).

O HPC é uma estrutura límbica que desempenha um papel importante na aprendizagem e memória e está implicado em comportamentos relacionados à dependência. Essa região envia projeções glutamatérgicas a várias regiões do circuito de recompensa (JOFFE; GRUETER; GRUETER, 2014). Na verdade, o NAc é innervado pelo subiculum ventral do HPC, que acredita estar envolvido na transmissão de informações contextuais e relacionadas à memória e podem desempenhar um papel na busca pela droga (CROMBAG et al., 2008). De fato, a estimulação direta de axônios do HPC ventral no NAc reforça comportamentos relacionados com a dependência (BRITT et al., 2012).

O EST também é uma área cerebral que está envolvida no processo da dependência, integrando entradas do córtex, HPC e amígdala. O corpo estriado é dividido em região dorsal e região ventral, que inclui o NAc. No homem e em primatas não-humanos, o EST dorsal é ainda dividido em caudado e putâmen (HABER; FUDGE; MCFARLAND, 2000; JOFFE; GRUETER; GRUETER, 2014).

Em 1984, Mishkin e Petri sugeriram o envolvimento do EST no estabelecimento do “hábito” em humanos. A conectividade entre o NAc, mesencéfalo e estriado dorsal

podem ser responsáveis pela transição de comportamentos habituais observados na progressão da dependência (BELIN; EVERITT, 2008; HABER; FUDGE; MCFARLAND, 2000; MISHKIN; PETRI, 1984). O EST dorsal tem sido implicado em comportamentos repetitivos e parece mediar movimentos estereotipados observados durante a intoxicação por estimulantes (GRUETER; ROTHWELL; MALENKA, 2012; JOFFE; GRUETER; GRUETER, 2014). Outras evidências para o papel da disfunção do EST dorsal na expressão de comportamentos compulsivos residem no envolvimento desta região na fisiopatologia da desordem obsessivo-compulsiva e distúrbio de personalidade obsessivo-compulsiva (GRUETER; ROTHWELL; MALENKA, 2012; JOFFE; GRUETER; GRUETER, 2014).

Drogas de abuso alteram a estrutura cerebral e a função cerebral, resultando em mudanças que persistem por longo tempo após o uso da droga ter cessado (DILEONE; TAYLOR; PICCIOTTO, 2012). Isso deve explicar o fato de usuários de drogas ficarem sob o risco de recaída mesmo após longo período de abstinência e apesar das consequências potencialmente devastadoras causadas pelo consumo de drogas. Neuroadaptações que ocorrem no fenômeno da adição - uma doença complexa, que afeta a função cerebral e o comportamento - a drogas estão associadas à modulação dos processos de memória e aprendizagem associativa, e não apenas com processos envolvidos no reforço/recompensa (AULTMAN; MOGHADDAM, 2001; CONTI, 2013; DUNNETT; WAREHAM; TORRES, 1990; ZAHRT et al., 1997). Os processos de memória operacional são influenciados por sistemas modulatórios, especialmente a neurotransmissão dopaminérgica e colinérgica do CPF (AULTMAN; MOGHADDAM, 2001; DUNNETT; WAREHAM; TORRES, 1990; ZAHRT et al., 1997)

1.3 O CÓRTEX PRÉ-FRONTAL E A MEMÓRIA OPERACIONAL

O CPF é a região responsável pelo julgamento, memória de trabalho, atenção, e controle das respostas emocionais (GOLDSTEIN; VOLKOW, 2002). Outra função cognitiva importante é o autocontrole, que é a habilidade de uma pessoa avaliar os riscos e benefícios em tomada de decisões. Isto é pertinente à dependência, uma vez que, apesar de haver consciência das devastadoras consequências das drogas,

os indivíduos dependentes demonstram uma capacidade diminuída de inibir a busca excessiva pela droga (GOLDSTEIN; VOLKOW, 2011). As drogas de abuso afetam essa região, tornando o usuário incapaz de considerar as consequências dos seus atos. Deve-se ressaltar ainda que os usuários de *crack* apresentam um descontrole comportamental muito mais exacerbado do que se observa com outras drogas de abuso, o que sugere que essa droga afeta de forma importante a região do CPF (OLIVEIRA; NAPPO, 2008; RIBEIRO; SANCHEZ; NAPPO, 2010).

Em um artigo clássico de 1995, Goldman-Rakic propôs que o CPF era essencial para a memória operacional (GOLDMAN-RAKIC, 1995). O termo memória operacional foi proposto inicialmente por Miller, Galanter e Pribram na década de 60 (BADDELEY; LOGIE, 1999). Contudo ao longo do tempo foi modificado e complementado por outros autores. A memória operacional se refere ao armazenamento temporário e manipulação de informações necessárias para a execução de tarefas complexas como compreensão da linguagem, aprendizado e raciocínio. O termo é aplicado a um tipo de memória que é ativa e relevante apenas por um período de tempo. Um exemplo comum de memória operacional é manter na mente um novo número de telefone lido, até que se realize a discagem e então imediatamente esquecê-lo (GOLDMAN-RAKIC, 1995).

Várias estruturas cerebrais estão interligadas no processamento da memória operacional: os córtices temporal e parietal, que realizam o processamento inicial das informações que provêm das aferências sensoriais; o HPC que possibilita a recuperação de informações previamente consolidadas que possam estar relacionadas ao contexto necessário; e o NAc e a ATV, que possibilitam juntamente com as estruturas do sistema motor o direcionamento das ações para uma determinada resposta (por exemplo, uma resposta motora ao ambiente) (FUSTER, 2002). Além disso, conexões entre regiões específicas do EST e do córtex, indica a existência de circuitos relacionados ao sistema motor e outros, envolvidos em diferentes funções, como emocionais, cognitivas e motivacionais (SAINT-CYR, 2003; YELNIK, 2008). Segundo Izquierdo (1989), os circuitos também são responsáveis por conectarem os núcleos da base ao CPF, o qual é fundamental para o processamento da memória operacional. Essa associação do CPF com outras regiões cerebrais, de forma a manter um circuito de reverberação durante a

execução da memória operacional, parecer ser crucial para sustentação da informação enquanto durar uma tarefa (FUSTER, 2002).

No âmbito da neurociência comportamental em animais de laboratório, a memória operacional está associada aos paradigmas com retardos, sendo o labirinto radial um dos principais modelos experimentais. Neste contexto, ela possui uma definição diferente da utilizada pela psicologia cognitiva: uma função cognitiva que capacita o animal a localizar-se no espaço através da lembrança de onde ele esteve anteriormente, denominada memória operacional espacial (GAGLIARDO; MAZZOTTO; DIVAC, 1997; OLTON, 1979). O modelo do labirinto radial foi proposto por Olton e Samuelson em 1976, e pode ser utilizado em diferentes protocolos experimentais em diferentes versões, e estariam avaliando funções cognitivas distintas, incluindo a memória operacional (OLTON; SAMUELSON, 1976).

Através da avaliação das áreas do funcionamento cognitivo como, atenção, memória, aprendizagem, funções executivas, funções viso-espaciais, linguagem e funções intelectuais, estudos revelam que o abuso de *crack* está relacionado a déficits cognitivos (BECHARA et al., 2001; BOLLA; ROTHMAN; CADET, 1999; CUNHA et al., 2004). Esses déficits cognitivos, semelhantes aos que ocorrem em transtornos da cognição, possivelmente estão relacionados a alterações na região pré-frontal e temporal (BECHARA et al., 2001; CUNHA et al., 2004). Uma vez que o CPF possui conexões com outras regiões cerebrais, de forma a manter um circuito de reverberação durante a execução da memória operacional (FUSTER, 2002), alterações nessas áreas cerebrais implicariam em prejuízos na memória operacional de um usuário de *crack*. De fato, estudos relacionam prejuízos de aprendizagem e memória ao estresse oxidativo no sistema nervoso central (BASHKATOVA et al., 2005; GÖNENÇ et al., 2005; POMIERNY-CHAMIOŁO et al., 2013; SUDAI et al., 2011), dado que é cada vez mais reconhecido o envolvimento de espécies reativas de oxigênio em causas de dano e morte celular (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004; MATÉS, 2000)

1.4 ESTRESSE OXIDATIVO

No final do século XIX, os efeitos tóxicos do oxigênio sobre componentes biológicos já eram conhecidos, tornando-se objeto de investigação científica (HALLIWELL, 2000). Os radicais livres estão envolvidos em uma grande variedade de doenças, incluindo câncer, doenças hepáticas e neurodegenerativas, envelhecimento e aterosclerose (CHIRICO et al., 1993; CHISOLM; STEINBERG, 2000; DRECHSEL; PATEL, 2009; GEDDES et al., 1997; JENNER; OLANOW, 1996; YANAGIDA et al., 2009).

O termo radical livre é frequentemente utilizado para designar qualquer átomo ou molécula com existência independente, contendo um ou mais elétrons desemparelhados, nos orbitais externos (URSO; CLARKSON, 2003). Isso determina uma atração para um campo magnético, o que pode torná-lo altamente reativo, capaz de reagir com qualquer composto situado próximo à sua órbita externa, passando a ter uma função oxidante ou redutora de elétrons (DRÖGE, 2002; HALLIWELL; GROOTVELD; GUTTERIDGE, 1988; HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

Espécies reativas de oxigênio (ERO) é um termo que inclui os radicais livres que contenham um átomo de oxigênio e compostos oxigenados não-radicaais altamente reativos, tais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peroxinitrito ($ONOO^-$). Uma característica das ERO é que alguns deles, tais como superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio, são normalmente produzidas em células vivas e apresentam vários efeitos biológicos, incluindo a geração de novos radicais prejudiciais as células (CASTAGNE et al., 1999; DRÖGE, 2002; HALLIWELL, 1992; MATÉS, 2000).

O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre agentes oxidantes e sistemas de defesas antioxidantes, pela perda da velocidade em remoção de ERO ou devido a produção excessiva destas moléculas. Os radicais superóxido e hidroxila estão associados a aumentos dos processos peroxidativos e, quando ligados a baixas concentrações de antioxidantes, estão envolvidos em um grande número de doenças degenerativas (MATÉS, 2000). Estudos demonstram seu envolvimento na patogênese da doença de Alzheimer, da doença de Parkinson, e também na isquemia cerebral (DRECHSEL; PATEL, 2009; GEDDES et al., 1997; JENNER; OLANOW, 1996; YANAGIDA et al., 2009).

Um dos principais mecanismos que resultam na degradação de macromoléculas produzido pelo estresse oxidativo é a peroxidação lipídica. A reação de ERO com os ácidos graxos poliinsaturados, presentes nas membranas celulares e nas lipoproteínas, inicia um processo em cadeia conhecido como peroxidação lipídica (ou lipoperoxidação), que pode ser avaliado pela medida de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) e utilizado como um indicador de estresse oxidativo celular (ENGLAND et al., 1998). O Malondialdeído (MDA), que tem sido considerado um biomarcador global do dano oxidativo, é um produto secundário da peroxidação lipídica, derivado da quebra do ciclo de ácidos graxos poli-insaturados e da ligação com os ácidos linoleico, araquidônico e docosahexanoico, podendo ser medido em sua forma livre por meio da utilização do ácido tiobarbitúrico (TBA); esses ácidos, ao reagirem entre si, formam uma composição de coloração rosa (Figura 8) (VASCONCELOS et al., 2007).

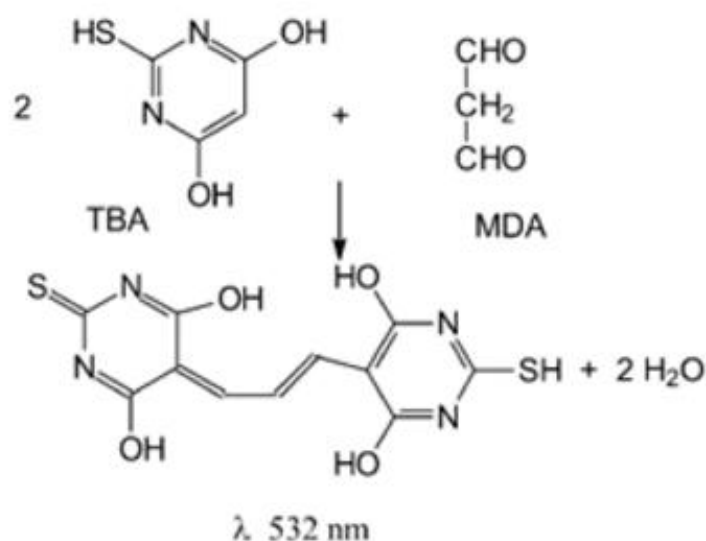


Figura 8. Reação utilizada para detecção de malondialdeído (MDA). Ao homogenato é adicionado ácido tiobarbitúrico (TBA), que reage com o Malondialdeído MDA e forma um cromógeno que absorve a 532 nm. Fonte: Retirado de Vasconcelos et al., 2007.

O dano oxidativo também pode ocorrer em proteínas, e os principais mecanismos são: a) oxidação de um aminoácido específico (Figura 9); b) formação de um peptídeo mediado por um radical livre; e c) alteração numa cadeia peptídica em decorrência da reação com lipídios oxidados. A modificação de proteínas aumenta a

susceptibilidade à proteólise enzimática. O dano oxidativo em produtos de proteínas pode afetar a atividade de enzimas, receptores, e transportadores de membrana. Produtos proteicos danificados oxidativamente podem conter grupos muito reativos que podem contribuir para danificar a membrana e funções celulares (LOBO et al., 2010).

Os produtos avançados de oxidação proteica (AOPP) tem sido considerado um novo marcador de oxidação proteica e de inflamação. Ele é formado durante o estresse oxidativo pela reação de proteínas plasmáticas com oxidantes clorados (WITKO-SARSAT et al., 1998). Níveis elevados de AOPP são encontrados em pacientes com patologias caracterizadas por altos níveis de produção de ERO, como diabetes, nefropatia diabética e retinopatia, tendo sido também propostos como mediadores patogênicos (KALOUSOVÁ; SKRHA; ZIMA, 2002; PANDEY; RIZVI, 2010; PIWOWAR; KNAPIK-KORDECKA; WARWAS, 2007). Já foi observada na doença de Alzheimer uma maior acumulação de AOPP, e isso é um fator importante, pois o acúmulo de produtos de oxidação em regiões específicas do cérebro parece estar relacionado com déficits cognitivos específicos (DEAN et al., 1997)

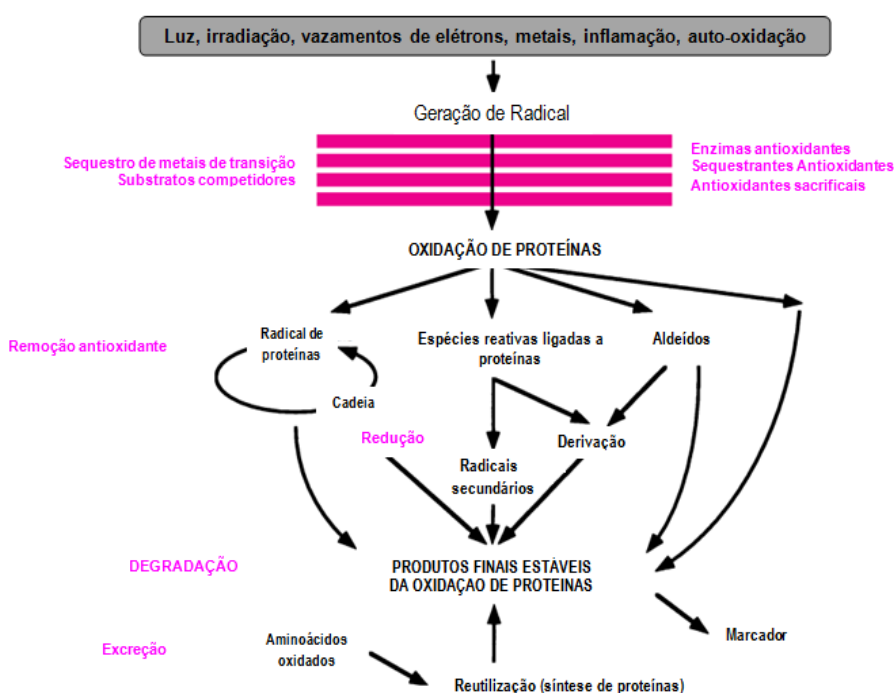


Figura 9. Mecanismos postulados de oxidação de proteínas in vivo: Os processos descritos em rosa são as que podem resultar na melhoria dos danos da proteína in vivo. Fonte: Adaptado de Dean et al., 1997.

1.4.1 Sistema de Defesa Antioxidante

O excesso de ERO no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo organismo ou absorvidos da dieta. Segundo Halliwell, (2000), antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações comparado à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo.

Os antioxidantes podem ser classificados em antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos. Os Antioxidantes não enzimáticos incluem compostos que necessitam ser absorvidos pela alimentação, como tocoferol (vitamina E), beta-caroteno (pro-vitamina A), ácido ascórbico e os oligoelementos (zinco, cobre, selênio), e compostos sintetizados pelo organismo humano, como a bilirrubina, ceruloplasmina, hormônios sexuais, melatonina, ácido úrico, e o principal e mais abundante antioxidante não-enzimático do organismo, a glutathiona reduzida (GSH) (FANG; YANG; WU, 2002; MATÉS, 2000; URSO; CLARKSON, 2003; YU, 1994).

O sistema enzimático é composto por três enzimas: a superóxido dismutase (SOD) é uma metaloenzima que catalisa a dismutação do $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 , enquanto que a catalase (CAT) é uma ferrihemoenzima responsável pela decomposição direta do H_2O_2 formando H_2O e O_2 ; e a glutathiona peroxidase (GPX) catalisa a decomposição de peróxidos através da oxidação da glutathiona reduzida (GSH), formando glutathiona oxidada (GSSG). Fisiologicamente, a GPx atua acoplada à enzima glutathiona redutase (GSR) que por sua vez, catalisa a redução da GSSG, usando dinucleotídeo de nicotinamida e adenina fosfato reduzida (NADPH) como coenzima (Figura 10) (FRIDOVICH, 1998; HALLIWELL, 2001; YU, 1994).

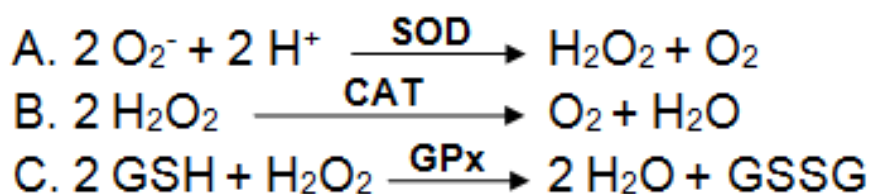


Figura 10. Reações de antioxidantes. A) Reação química catalisada pela superóxido dismutase (SOD). O radical superóxido é dismutado em peróxido de hidrogênio e em oxigênio molecular. B) Reação química catalisada pela enzima catalase. Degradação do peróxido de hidrogênio a oxigênio molecular e água. C) Reação química catalisada pela enzima glutatona peroxidase (GPx). Glutaciona reduzida e peróxido de hidrogênio são oxidados a água e glutatona oxidada. Fonte: Vasconcelos et al., 2007.

Os antioxidantes podem diminuir o nível celular de radicais livres, quer por inibição da atividade ou expressão de enzimas geradoras de radicais livres, tais como a NADPH-oxidase e xantina-oxidase ou através do reforço da atividade e expressão das enzimas antioxidantes: SOD, CAT e GPx (Figura 11) (HALLIWELL, 2000; LÜ et al., 2010).

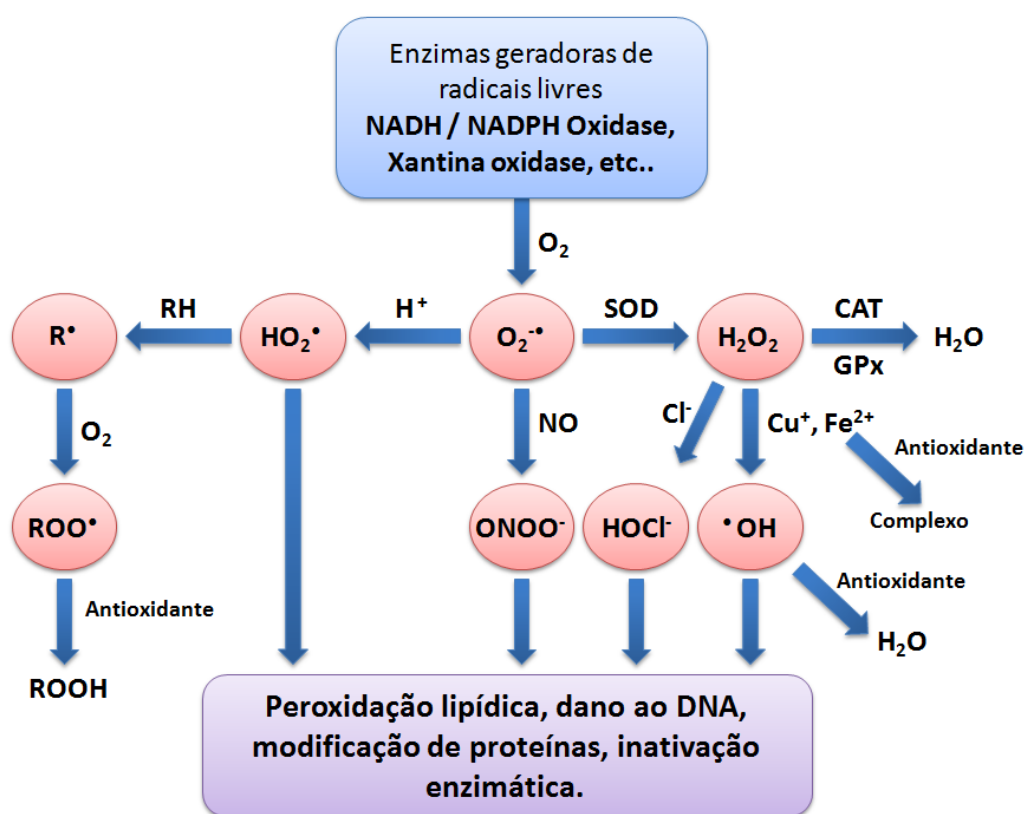


Figura 11. Vias de produção e liberação de ERO. $O_2^{\bullet-}$ - ânion superóxido; HO_2^{\bullet} - radical perhidroxila; $^{\bullet}OH$ - radical hidroxila; H_2O_2 - peróxido de hidrogênio; $HOCl$ - ácido hipocloroso; $ONOO^-$ - peroxinitrito; R^{\bullet} - radical alquil lipídico; RH - lípidos; ROO^{\bullet} - radical peroxil lipídico; $ROOH$ - hidroperóxido de lipídico; SOD – superóxido dismutase; CAT - catalase e GPx - glutatona peroxidase. Fonte: Adaptado de Lü et al., 2010.

1.4.2 Neurotoxicidade da cocaína/crack

A toxicidade da cocaína é um fenômeno complexo. Estudos demonstraram produção de ERO após a administração de doses de cocaína, e concluíram que o dano oxidativo pode estar envolvido com aumento de ERO em áreas relacionadas aos efeitos da cocaína no sistema nervoso central (DIETRICH et al., 2005; MACÊDO et al., 2010; NUMA et al., 2008; POMIERNY-CHAMIOŁO et al., 2013).

No entanto, há poucos estudos sobre estresse oxidativo e a dependência ao *crack*, e as discrepâncias foram relatadas por estudos clínicos recentes, em sangue periférico de humanos, focados nos efeitos relacionados ao *crack* em biomarcadores oxidantes (NARVAEZ et al., 2013; SORDI et al., 2014) e nos níveis de defesas antioxidantes durante a fase de retirada da droga (ZAPARTE et al., 2015). Porém, ainda não há um estudo que relacione o estresse oxidativo em regiões cerebrais aos efeitos do *crack* em animais que foram submetidos à inalação de *crack*. Os resultados desse estudo seriam de grande importância visto que a acumulação de DA não recaptada na fenda sináptica, pelo uso de cocaína, pode causar estresse celular (HASTINGS, 1995).

Portanto, esse estudo com abordagem experimental vem contribuir para novas informações sobre os prejuízos cognitivos do *crack*, uma vez que há muito a ser elucidado sobre os efeitos dessa droga, devido às suas características bem específicas. Apesar de possuírem o mesmo princípio ativo, evidências sugerem diferenças de efeitos quando se observam as duas principais formas de consumo da droga. Deste modo, buscamos reproduzir, no animal, a forma de consumo de *crack* que ocorre no homem e com isso tornar factível a verificação de diferentes parâmetros moleculares e comportamentais.

2 OBJETIVOS

Geral

Investigar os efeitos da inalação direta de *crack* sobre parâmetros de estresse oxidativo e comportamentais.

Específicos

1. Avaliar os efeitos da inalação direta de *crack* ou inalação simulada (*sham*) sobre a memória operacional espacial;
2. Avaliar os efeitos da inalação direta de *crack* ou inalação simulada (*sham*) sobre parâmetros oxidativos no CPF, HPC e EST através da análise de:
 - Produtos avançados de oxidação proteica (AOPP);
 - Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS);
 - Atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados 25 ratos Wistar machos, (50-60 dias), pesando entre 250 e 300g, provenientes do biotério central do Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais no biotério do Laboratório de Ciências Cognitivas e Neuropsicofarmacologia (LCCNPF) do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, em ambiente climatizado ($22^{\circ}\text{C} \pm 2$), num ciclo claro-escuro artificial de 12 h (luzes acesas às 7 h), com água *ad libitum* e sob privação parcial de alimento, porém de modo a mantê-los em aproximadamente 80 a 85% do peso corporal inicial ajustado ao crescimento.

Neste estudo foram respeitados os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, www.cobea.org.br), que está em conformidade com normas internacionais de pesquisa que envolve animais. Este projeto foi submetido à Comissão de Ética de Uso e Experimentação Animal (CEUA) do CCS/UFES, aprovado sob o número 010/2015.

3.2 DROGA

O material para as avaliações neste estudo foi o *crack*, cedido pela Polícia Civil do Estado do Espírito Santo, via Superintendência de Polícia Técnica do Estado, respeitando um convênio firmado entre a Superintendência de Polícia Técnico Científica e a Universidade Federal do Espírito Santo (cooperação científica 05/2011). Cumpre mencionar que os Laboratórios LCCNPF e de Neurotoxicologia e Psicofarmacologia (LANEP) têm autorização oficial emitida por um Juiz de comarca local para a utilização da droga exclusivamente em Pesquisa Animal.

O *crack* foi entregue no LCCNPF em carro oficial com documentação emitida por um juiz, armazenado em dessecador e mantido em um cofre. Apenas dois pesquisadores tiveram acesso ao composto, garantindo um controle rígido da

segurança da droga. A pedra apreendida e que se tornou objeto desse estudo, foi obtida de fonte única compondo um único lote lacrado, contendo a droga *in natura*.

O material teste foi submetido à análise para avaliação da porcentagem de cocaína presente em sua composição pelo núcleo de toxicologia forense do DML de Vitória, ES. A porcentagem de cocaína encontrada foi de 26%.

3.3 EXPERIMENTO COMPORTAMENTAL

O labirinto radial de oito braços (LR-8) foi proposto com a finalidade de avaliar a aprendizagem e memória, permitindo o direcionamento de pesquisas para aspectos mais específicos e sutis das funções cognitivas (BECKER; WALKER; OLTON, 1980; OLTON; SAMUELSON, 1976). Posteriormente, esse paradigma também foi introduzido como uma ferramenta comportamental para investigar os efeitos de diversas drogas psicotrópicas sobre a função da memória operacional espacial (NAKAMURA-PALACIOS; ROELKE, 1997; NAKAMURA et al., 1991; OLIVEIRA et al., 1990; SILVA DE MELO et al., 2005).

O LR-8 é construído em acrílico transparente, possuindo uma área central de base octogonal com 33 cm de diâmetro, de onde partem oito braços simétricos e removíveis com 65 cm de comprimento, 10 cm de largura e paredes laterais de quatro cm de altura. No final de cada braço estão fixados receptáculos de acrílico preto com 11 cm de comprimento, cinco cm de largura e três cm de profundidade para colocação do reforço (pedaços de amendoim). A plataforma central é constituída, em suas margens, de paredes de acrílico transparente de 30 cm de altura, nas quais se encontram portas deslizantes em forma de guilhotina que permitem o acesso aos braços. As portas estão presas a fios de nylon que ficam sob o controle do examinador, o qual se encontra à distância do labirinto para abertura e fechamento das mesmas. Placas de acrílico transparente com 20 cm de altura estão fixadas na entrada das portas para evitar que o animal atravessasse de um braço a outro. O aparato é montado sobre uma armação de madeira compensada revestida de fórmica branca e sustentado por um suporte de metal a 100 cm do assoalho.

O LR-8 fica sempre posicionado no mesmo local, numa sala com temperatura controlada, iluminação própria e sem a presença de ruídos que possam interferir na execução do procedimento. Neste estudo, a versão de labirinto radial utilizada para a avaliação de memória operacional foi a espacial. Por isso, no local onde se encontrava o labirinto foram colocados estímulos visuais distais fixos (quadros, armário, portas, cortinas, etc.) que favoreciam a orientação espacial do animal.

3.3.1 Aquisição de Tarefa

Para a aquisição da tarefa, os animais foram submetidos a sessões de treinamento (uma sessão diária, cinco dias por semana) no LR-8 (Figura 12) sob privação parcial de alimento, de modo a mantê-los em aproximadamente 80 a 85% do peso corporal inicial, para possibilitar a aquisição das tarefas no decorrer dos treinos. A aquisição da tarefa constitui-se de cinco fases, a saber:

- Fase I: Os animais foram colocados no centro do labirinto com todas as portas abertas para exploração e adaptação no ambiente durante 10 minutos por dois dias consecutivos.



Figura 12. Labirinto Radial de oito braços (LR-8). Fonte: Acervo pessoal.

- Fase II: Pedacos de amendoim (reforço) foram colocados nos receptáculos e os animais tiveram livre acesso aos braços, a fim de localizar e consumir o reforço no final de cada braço, em um período de 10 min. Sempre que o reforço fosse consumido, um novo pedaço de amendoim era devidamente repostado no receptáculo de origem.
 - o Fase IIa – em cada braço do labirinto, havia pequenos pedaços de amendoim, sendo essa fase denominada de ‘com trilha’. Essa fase perdurou até que o animal aprendesse a ir até o receptáculo e encontrasse o reforço (Figura 13). Os animais tiveram livre acesso aos braços.
 - o Fase IIb – havia reforço apenas no receptáculo, sendo essa fase denominada de ‘sem trilha’.



Figura 13. Animal que encontrou o reforço no receptáculo. Fonte: Acervo pessoal.

- Fase III: Uma vez que o animal localizou o reforço, o mesmo foi colocado no centro do labirinto com todas as portas abertas. Após entrar em um dos braços, a porta que permitia o acesso àquele braço era fechada e o animal colocado novamente no centro do labirinto com livre acesso aos outros braços. Esta fase terminou quando o animal percorreu todos os braços em até 10 minutos, numa mesma sessão.

- Fase IV: É a fase de aquisição da tarefa propriamente dita, em que o animal deve aprender a entrar em cada braço apenas uma vez. Todas as portas foram abertas a cada recolocação do animal no centro do labirinto. O mesmo devia aprender a visitar cada um dos braços apenas uma única vez em cada sessão. É considerado erro de desempenho a repetição de um braço já visitado pelo animal. Os animais foram treinados até atingirem o critério de 0 a 1 erro por sessão, ao longo de três sessões consecutivas de treinamento. Foram necessárias cerca de 10 sessões até que os animais atingissem o critério e estivessem aptos a seguirem para a próxima fase de treinamento.

- Fase V: Nesta fase foi introduzido um intervalo de retenção (retardo) entre o quarto e quinto braços visitados, com o intuito de se avaliar a memória operacional espacial. A sessão de treinamento era dividida em duas partes: na primeira corrida (pré-retardo) quatro portas foram abertas aleatoriamente e os animais alcançavam o reforço. Após terem visitado o quarto braço, eles eram levados até a gaiola-casa onde permaneciam por um período de cinco segundos. Na segunda corrida ou pós-retardo os animais foram recolocados no centro do labirinto e, estando todas as portas abertas, eles deveriam entrar nos quatro braços ainda não visitados (Figura 13). Os animais foram treinados até atingirem um critério de 0 a 1 erro por sessão, tanto no pré- como no pós-retardo, em três sessões consecutivas. Foram necessárias cerca de seis sessões para que os animais atingissem o critério, estando aptos então a serem submetidos à inalação ativa ou simulada.

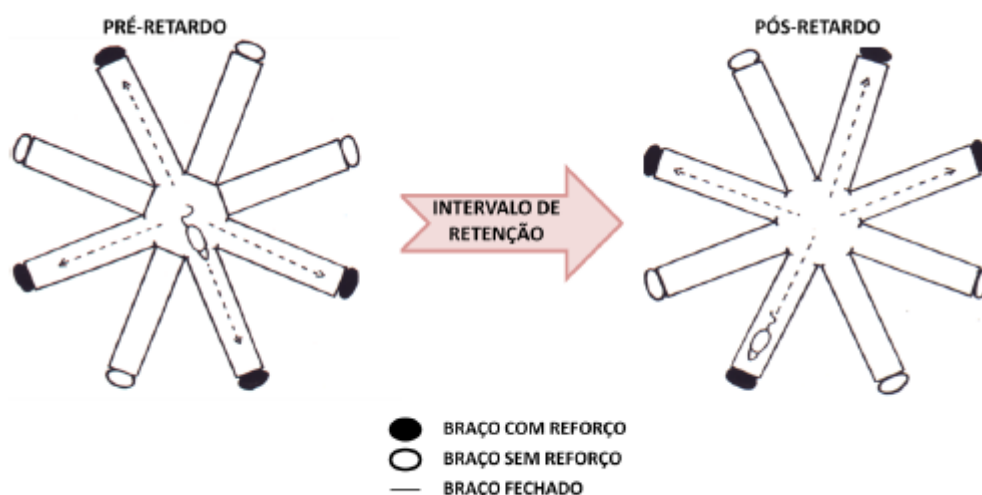


Figura 14. Labirinto Radial de oito braços (LR-8) - Desenho esquemático da fase V representando o pré e pós-retardo. Fonte: Retirado de Nakamura et al., 1991.

3.4 INALAÇÃO DIRETA DE *CRACK*

Um grupo de animais alocados randomicamente (por randomização gerada pelo site www.randomization.com) ($n = 13$) foi submetido à inalação de 3 g de *crack* por cinco minutos, uma vez ao dia, ao longo de cinco dias (grupo CK). Um outro grupo de animais ($n = 12$) foi exposto a uma outra caixa de inalação com as mesmas medidas, sob as mesmas condições, sem a droga, num protocolo de inalação simulada (grupo *sham*). O protocolo de inalação de *crack* utilizado foi adaptado a partir de Areal et al., (2015). O sistema de inalação é constituído por três partes (Figuras 15 e 16):

1. Queima e produção da fumaça de *crack*: a droga foi acondicionada em um kitassato e a queima das pedras foi promovida por uma chapa de aquecimento onde o kitassato é mantido apoiado. A chapa permite manter a temperatura de queima constante (350°C em todas as sessões) durante todo o experimento. Esta temperatura permite a formação visível da fumaça, sendo suficiente para a queima de 3 g da droga em cinco minutos, garantindo a formação de quantidade considerável de AEME, podendo formar de 50 a 80 % de AEME a 255-420°C (PAUL et al., 2005). Assim, a fumaça produzida é então direcionada para a câmara de inalação;

2. Câmara de inalação: consiste em uma caixa de acrílico com dimensões de 25 x 15 x 30 cm, com tampa, onde o animal é colocado. O aparelho permite que os animais se desloquem livremente durante o processo de inalação. O kitassato foi colocado através de uma mangueira diretamente a um orifício lateral na câmara de inalação. Na lateral oposta, outro orifício conectado a outra mangueira permitia a saída da fumaça;
3. Controle do fluxo da fumaça: esse controle foi realizado através da criação de pressão positiva de ar por meio de uma bomba de vácuo conectada ao kitassato. Essa pressão promoveu o fluxo da fumaça para dentro da câmara de inalação e a mesma saiu por um orifício no lado oposto da câmara, cuja saída se deu por meio de uma tubulação direta para o exterior do edifício, de modo a não haver escape de fumaça para o interior da sala experimental. Todo o procedimento de inalação ocorreu numa cabine de segurança biológica nível 4.



Figura 15. Aparato de inalação de *crack* utilizado no estudo: Animal que recebeu inalação direta de *crack*. É possível visualizar a caixa de inalação com o animal recebendo a fumaça vinda do kitassato que está sobre a chapa de aquecimento. Destaque para conexões da mangueira saindo da bomba a vácuo. Fonte: Acervo pessoal.



Figura 16. Aparato para simulação de inalação: Animal *sham*. Podemos observar que o animal está em outra caixa, porém com a mesma dimensão que a do grupo tratado. A bomba é mantida ligada durante todo o experimento. Fonte: Acervo pessoal.

Durante os cinco dias de inalação ativa ou inalação simulada, os animais foram submetidos a dois dias de treinamento no LR-8 com retardo de cinco segundos, para manutenção do critério. 24 horas após a última exposição ao *crack* ou inalação simulada (*sham*) os animais foram levados ao LR-8 para desempenho de tarefas com retardo de 1 hora para avaliação da memória operacional espacial (Figura 17).

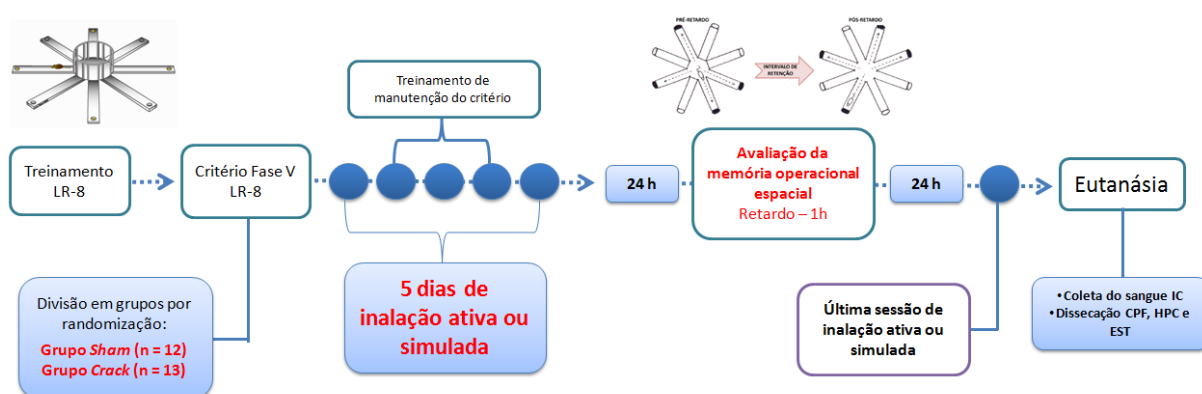


Figura 17. Diagrama do protocolo experimental.

3.4.1 Eutanásia e dosagem de AEME, cocaína e seus metabólitos

Para validar nosso modelo animal de *crack*, avaliamos as concentrações de AEME, cocaína e seus metabólitos no sangue de ratos expostos ao *crack*, utilizando Cromatografia gasosa acoplada a espectro de massa (GC-MS) como descrito anteriormente por Pelicao et al., (2014). 24 horas após terem realizado tarefas com o retardo de 1 hora no LR-8, os animais foram submetidos a uma última sessão de inalação ativa ou simulada. Para realizar a coleta de sangue intracardíaco de cada animal para a quantificação de AEME, cocaína e seus metabólitos, foi necessário anestésiar os animais com Cloridrato de Cetamina (75 mg / kg) + Cloridrato de Xilazina (10 mg / kg), respeitando um volume de administração de 0,1 mL / 100 g de peso corporal pela via intraperitoneal (IP), dado que o procedimento de decapitação impossibilitava a coleta de um volume mínimo de 2 ml e resultava em um sangue com muitas impurezas (pelos e tecido). Os animais do grupo *sham* foram eutanaziados utilizando o mesmo procedimento que os animais do grupo *crack*, mas não foi coletado sangue deste grupo, uma vez que a AEME e os metabólitos de cocaína não seriam detectados nestas amostras. A análise foi realizada pelo Departamento Médico Legal da Superintendência de Polícia técnica do Espírito Santo, e foram descartados os animais que não tiveram presença de AEME no sangue. Para as análises bioquímicas o cérebro foi rapidamente removido e realizado a dissecação das áreas de interesse nesse estudo: CPF, HPC e EST. As áreas retiradas foram colocadas em eppendorff previamente identificados, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80 °C.

3.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

3.5.1 Preparo das amostras e quantificação de proteína

Todos os testes bioquímicos foram realizados com n = 5-7 por grupo (*sham* e *CK*). As estruturas cerebrais foram pesadas e homogeneizadas (1:10) no tampão fosfato de sódio 20 mM com KCl 140 mM, pH 7,4. O homogenato foi centrifugado a 3500 rpm por 10 minutos a 4 °C. O sedimento foi descartado e o sobrenadante foi imediatamente separado e utilizado para as análises.

Para a dosagem de proteínas foi utilizado o método de Lowry et al., (1951). Como padrão foi empregado à albumina de soro bovino.

3.5.2 Determinação dos Produtos Avançados de Oxidação Proteica (AOPP)

Os produtos avançados de oxidação proteica (AOPP) foram avaliados como descrito por Witko-Sarsat et al., (1998). 40 μ L do homogenato tecidual do CPF, HPC e EST, foram diluídos (1:3) em solução tampão fosfato de sódio 20 mM com KCl 140 mM, pH 7,4, ou solução de Cloramina T (0 a 10 μ mol / L), e foram adicionados em cada poço de uma placa de microtitulação de 96 poços. Logo após, 10 μ L de 1,16 mol / L de iodeto de potássio (KI) foram então adicionados, seguido de 20 μ L de ácido acético glacial. A absorbância da mistura de reação foi imediatamente lida a 340 nm em um leitor de microplacas, contrastado por um branco contendo 200 μ L de tampão fosfato de sódio, 10 μ L de KI e 20 μ L de ácido acético. A absorbância de Cloramina T a 340 nm foi linear dentro do intervalo de 0 a 100 μ mol / L. O AOPP foi determinado no coeficiente de correlação maior que 0.95. As concentrações foram expressas em μ mol / mg de proteína.

3.5.3 Ensaio de Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS)

Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) foram determinadas como descrito por Esterbauer e Cheeseman (1990). O homogenato tecidual foi desproteinizado com ácido tricloroacético a 10%, homogeneizado com 0,67% de TBA e aquecido num banho-maria a 100 °C durante duas horas. As amostras foram resfriadas e então 400 μ L de butanol foram adicionados e o produto submetido à agitação durante 20 segundos. Decorrido esse período o material foi centrifugado a 5000 rpm por três minutos. TBA-RS foi determinado pela absorbância a 535 nm lida em um leitor de microplacas. Os resultados foram apresentados como nmol / mg de proteína.

3.5.4 Atividade da enzima Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi realizada segundo Aebi (1984), utilizando um espectrofotômetro com controle de temperatura. Este método se baseia na redução da absorbância devido ao consumo de peróxido de hidrogênio a 240 nm pela ação da enzima catalase, em um meio de reação contendo 20 mM de H_2O_2 , 10% de Triton X-100 e tampão fosfato de potássio 10 mM. Os resultados da atividade foram apresentados como $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína.

3.5.5 Atividade da enzima Glutathione Peroxidase (GPx)

A atividade da GPx foi determinada pelo método de Wendel (1981) que utiliza o peróxido de terbutila como substrato da reação, ocorrendo a oxidação da glutathione reduzida (GSH) pela GPx gerando glutathione oxidada (GSSG), que é convertida em GSH pela glutathione redutase, consumindo nessa reação uma molécula de NADPH, a qual pode ser acompanhada em espectrofotômetro a 340 nm. O meio de reação foi composta por tampão K_2HPO_4 50 mM, pH 7,0, EDTA 1 mM, glutathione redutase 0,1 U / mL, GSH 1 mM, Azida Sódica 1 mM e NADPH 0,2 mM. A reação foi iniciada com adição de peróxido de terbutila 0,5 mM e acompanhada durante 3 minutos e 30 segundos utilizando um coeficiente de extinção de NADPH = $6,22 \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Os resultados da atividade foram apresentados como $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína.

3.5.6 Atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi adaptado de Bannister e Calabrese (1987) e determinada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina. Os volumes de 5, 10 e 15 μl foram retirados do homogenato tecidual e colocados em placas de 96 poços, a qual 5 μl de catalase (0,0024 mg / mL de água destilada), tampão de glicina 175-185 μl (0,75 g em 200 ml de água destilada a 32 °C, pH 10,2) e 5 μl adrenalina (60 mM em água destilada + 15 ml / ml de HCl) foram adicionados. As leituras foram realizadas espectrofotometricamente (480 nm) em leitor de microplacas à temperatura

ambiente durante 20 minutos com leitura de 40 em 40 segundos. Os resultados da atividade foram apresentados como $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Uma vez o animal inserido no protocolo, o peso corporal, número de erros cometidos em cada sessão e o tempo gasto em cada braço foram registrados durante todo o treinamento e na semana de inalação direta de *crack* ou inalação simulada.

Os pesos corporais dos animais foram registrados semanalmente ao longo do protocolo experimental com o objetivo de que mantivessem entre 80 e 85% ajustado ao crescimento. Os pesos corporais foram expressos como média em gramas e erro padrão da média (e.p.m.). Foi utilizada análise de variância (ANOVA) de uma via para medidas repetidas seguida de post-hoc de Tukey.

O desempenho dos animais na fase de aquisição de tarefa no LR-8 antes (fase IV) e depois da introdução do retardo de cinco segundos (fase V) foi avaliado pela análise dos erros cometidos nas dez e seis últimas sessões de treinamento, respectivamente. Os erros foram definidos como a repetição de braços já visitados em uma mesma sessão de treinamento e foram apresentados na forma de média de erros \pm erro padrão da média (e.p.m.). A análise de tempo gasto em cada braço foi avaliada pela relação entre o tempo total de permanência no LR-8 (em segundos) e o número de braços visitados naquela sessão, e foram também representados pela média de tempo (em segundos) \pm erro padrão da média (e.p.m.). Para todas essas análises foi empregada análise de variância (ANOVA) de uma via para medidas repetidas, seguida do teste de Tukey. Ainda, utilizou-se uma análise de regressão linear para verificar se houve uma diminuição progressiva no número de erros.

Nos grupos *CK* e *sham* foram considerados o número de erros cometidos e o tempo gasto em cada braço após inalação ativa ou simulada, tanto no pré- quanto no pós-retardo de 1 hora, apresentados na forma de média de erros \pm erro padrão da média

(e.p.m). No caso da existência de somente dois grupos experimentais, para essas análises foi utilizado o teste *t* de Student para amostras independentes.

Para avaliação da concentração de AOPP ($\mu\text{mol} / \text{mg}$ de proteína) foi utilizado o teste *t* de Student para amostras independentes para localização das diferenças estatisticamente significantes nas três áreas cerebrais estudadas (CPF, HPC e EST). O mesmo foi realizado para a análise da formação de lipoperóxidos pela medida de TBA-RS (nmol / mg de proteína) e para as atividades das enzimas antioxidantes SOD, GPx e CAT ($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína). Os dados foram apresentados na forma de média \pm erro padrão da média (e.p.m).

Para todas as análises foi empregado um nível de significância para $p < 0,05$. O software SPSS 20.0 (Inc, EUA) e o software Graphpad Prism 7.0 (La Jolla, CA 92037, EUA) foram utilizados para as análises estatísticas e representações gráficas, respectivamente.

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DOS PESOS CORPORAIS

No início do treinamento e semanalmente os animais foram pesados ao longo das cinco fases de treinamento no LR-8 a fim de que os mesmos mantivessem um peso corporal no mínimo entre 80 a 85% do peso inicial.

A ANOVA de uma via para medidas repetidas detectou diferenças significantes ao longo das fases [$F(5,120) = 71,41$; $p < 0,0001$]. A aplicação do teste de Tukey revelou que, em relação ao peso inicial, o peso corporal dos animais diminuiu significativamente na primeira fase ($p < 0,0001$), porém sem ultrapassar o limite inferior de 85% do peso inicial. Esta diminuição se deve a privação parcial de alimentos que se realiza durante o período de treinamento. Porém, na fase IV, a média do peso dos animais foi superior a primeira semana ($P < 0,01$), fato esperado, pois está de acordo com a curva natural de crescimento dos animais após o período de privação alimentar. A figura 18 ilustra estes resultados.

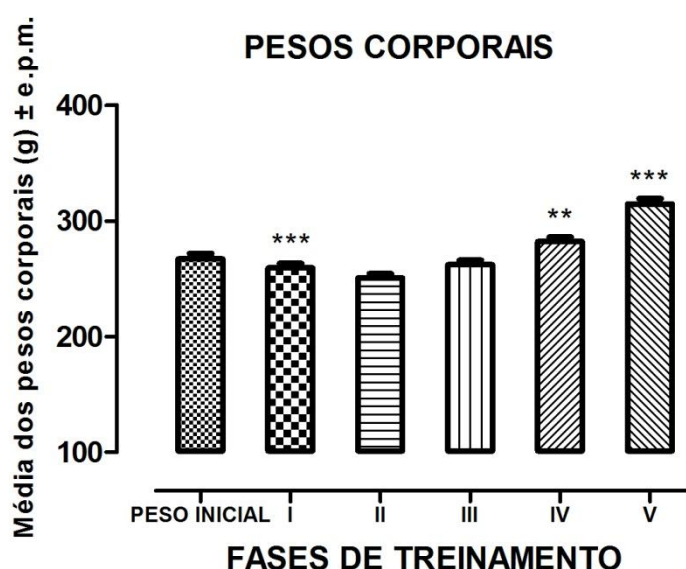


Figura 18. Média dos pesos corporais (g) ± e.p.m. dos animais nas fases de treinamento (n = 25). ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$ comparado ao peso inicial pela ANOVA de uma via para medidas repetidas com *post-hoc* de Tukey.

4.2 EXPERIMENTO COMPORTAMENTAL

4.2.1 Aquisição de tarefa – antes da introdução do retardo de 5 segundos

Os animais utilizados nesse estudo ($n = 25$) apresentaram melhora gradativa do desempenho no LR-8 ao longo das sessões, representada por uma diminuição gradativa no número de erros ao longo de dez sessões de treinamento, atingindo o critério de aprendizagem pré-estabelecido, de 0 a 1 erro por sessão ao longo de três sessões consecutivas.

A análise de regressão linear também demonstrou uma diminuição progressiva do número de erros ao longo das sessões de treinamento, atingindo o critério pré-estabelecido para aprendizagem [$F(1,8) = 51,94$; $y = -0,2887x + 3,448$; $r = 0,8665$; $p < 0,0001$] (Figura 19).

A ANOVA de uma via para medidas repetidas detectou diferenças estatisticamente significantes na comparação do número de erros cometidos pelos animais ao longo das sessões de treinamento [$F(9,22) = 14,55$; $r = 0,3774$; $p < 0,0001$]. De um modo geral, o teste de Tukey mostrou que os animais apresentaram significante ($p < 0,0001$) menor número de erros nas três últimas sessões quando comparadas às sessões 1, 2 e 6 (Figura 19). Este resultado é consistente com a melhora do desempenho dos animais no labirinto radial, fato esperado durante o processo de aprendizagem.

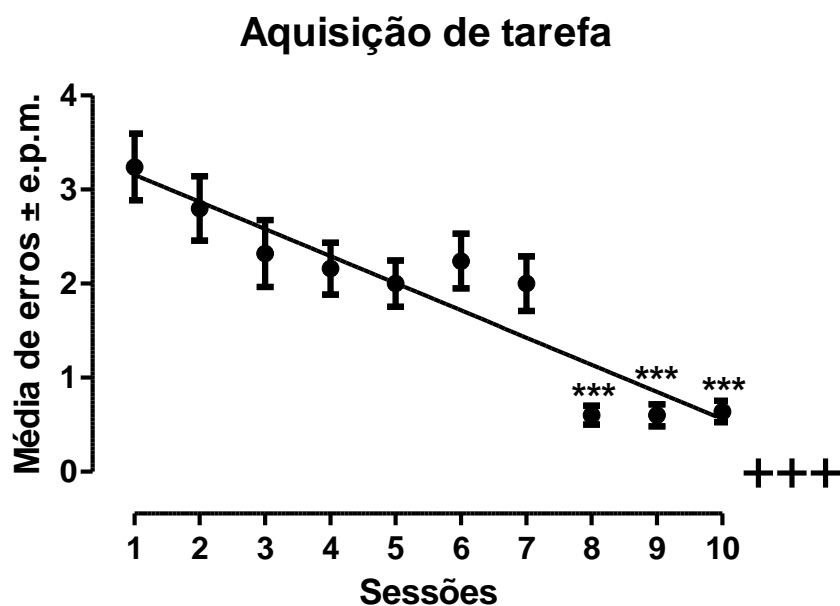


Figura 19. Média de erros \pm e.p.m. nas 10 últimas sessões de treinamento na fase IV (aprendizagem) no LR-8 ($n = 25$). +++ $p < 0,0001$ (Análise de regressão linear). *** $p < 0,0001$ comparada às sessões 1, 2 e 6 (ANOVA de uma via para medidas repetidas, seguida do Teste de Tukey).

O tempo gasto em cada braço visitado na fase de aquisição da tarefa antes do intervalo de retenção de 5 segundos (fase IV) está demonstrado na tabela 1. A ANOVA de uma via para medidas repetidas não detectou diferenças estatisticamente significantes no tempo gasto em cada braço visitado nas últimas 10 sessões de treinamento.

Tabela 1. Média do tempo gasto (segundos) \pm e.p.m em cada braço visitado nas 10 últimas sessões de treinamento na fase IV (aprendizagem) no LR-8 ($n = 25$)

Tempo gasto em cada braço (média em segundos \pm e.p.m.)			
Sessões	Média \pm e.p.m.	Sessões	Média \pm e.p.m.
1	16,6 \pm 2,7	6	14,4 \pm 1,6
2	13,4 \pm 1,6	7	14,8 \pm 1,9
3	14,9 \pm 3,2	8	12,1 \pm 1,0
4	11,6 \pm 1,0	9	13,3 \pm 1,4
5	17,5 \pm 4,6	10	14,3 \pm 2,2

4.2.2 Aquisição de tarefa – após a introdução do retardo de 5 segundos

Na fase V, ainda para a aquisição da tarefa no LR-8, porém com a introdução dos retardos de 5 segundos, os animais apresentaram, no pré e no pós-retardo, bom desempenho (0 a 1 erro) nas últimas três sessões de treinamento, que é pré-requisito para o aprendizado nesta fase. A análise de regressão linear demonstrou que houve diminuição progressiva do número de erros no pós-retardo [$F(1,4) = 27,17$; $y = -0,3566x + 2,1947$; $r = 0,8717$; $p = 0,0065$] no decorrer das seis sessões de treinamento (Figura 19).

A ANOVA de uma via para medidas repetidas, detectou a existência de diferenças estatisticamente significantes entre as sessões de treinamento da fase V [$F(5,12) = 21,62$; $r = 0,4739$; $p < 0,0001$]. A média de erros cometidos nas sessões 4, 5 e 6 foi significativamente menor ($p < 0,0001$) quando comparadas às sessões 1, 2 e 3 (Teste de Tukey) (Figura 20).

Retardo 5 segundos

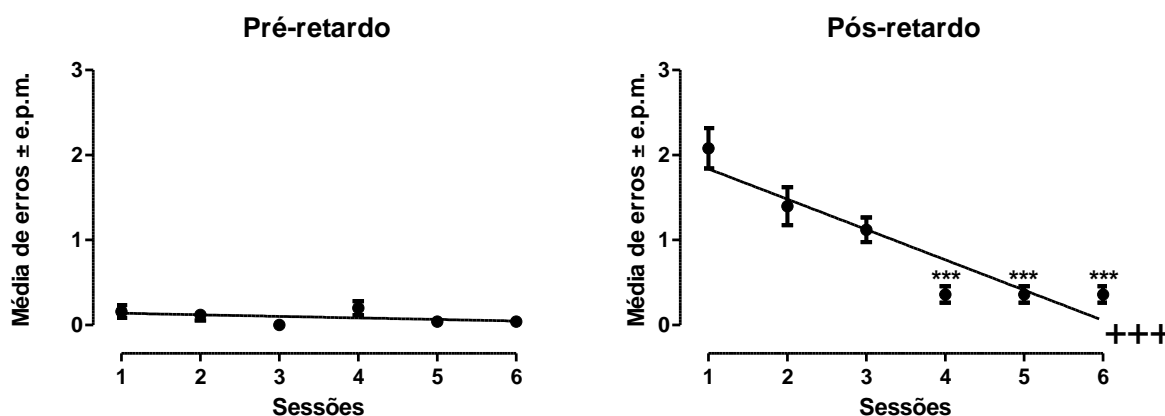


Figura 20. Média de erros \pm e.p.m. dos animais antes (pré-retardo) e após (pós-retardo) o retardo de 5 segundos nas sessões de treinamento da fase V para aquisição das tarefas no LR-8 ($n = 25$). +++ $p < 0,05$ (Análise de regressão linear) *** $p < 0,0001$ comparada com as sessões 1, 2 e 3 (ANOVA de 1 via para medidas repetidas, seguida do Teste de Tukey).

Na análise do tempo gasto em cada braço, foram encontradas diferenças estatisticamente significantes neste parâmetro apenas para o desempenho do pré-retardo de 5 segundos no decorrer das seis sessões de treinamento. A ANOVA de

uma via para medidas repetidas detectou diferenças estatisticamente significantes [$F(5,12) = 6,24$; $r = 0,2063$; $p < 0,0001$] entre as sessões de treinamento. O Teste de Tukey para comparações múltiplas demonstrou que o tempo gasto em cada braço foi significativamente menor no pré-retardo nas sessões 4, 5 e 6 quando comparadas a sessão 1 ($p < 0,0001$), demonstrando que há uma redução no tempo de desempenho no decorrer do treinamento (Tabela 2).

Tabela 2. Média do tempo gasto (segundos) \pm e.p.m. pelos animais em cada braço visitado no pré e pós-retardo de 5 segundos nas últimas seis sessões de treinamento na fase V ($n = 25$).

Tempo gasto em cada braço (média em segundos \pm e.p.m.)		
Sessões	Pré-retardo	Pós-retardo
1	22,7 \pm 2,7	22,3 \pm 2,8
2	16,9 \pm 1,8	16,2 \pm 0,9
3	12,2 \pm 0,9	16,2 \pm 2,4
4	11,6 \pm 2,5 ***	17,3 \pm 2,9
5	12,5 \pm 2,6 ***	20,6 \pm 4,5
6	11,9 \pm 2,0 ***	19,7 \pm 3,3

*** $p < 0,0001$ quando comparado à sessão 1 de treinamento pelo teste de Tukey

Ambos os resultados sugerem aquisição satisfatória da tarefa após a introdução do retardo de 5 segundos.

4.3 DESEMPENHO COMPORTAMENTAL (RETARDO 1 HORA)

O desempenho dos animais na realização dos testes com retardos de 1 hora no LR-8, após terem sido submetidos à inalação direta de *crack* (grupo CK) ou inalação simulada (grupo *sham*) pode ser observado na figura 21. A análise do desempenho foi feita com base no número de erros cometidos pelo animal em cada sessão de teste.

O teste de t de Student para amostras independentes detectou diferenças significantes ($p < 0,01$) entre os grupos no desempenho dos animais no pós-retardo.

Animais submetidos ao protocolo de inalação de *crack* por um período de cinco dias apresentaram um maior número de erros no LR-8 no pós-retardo de 1 hora quando comparados ao grupo *sham*.

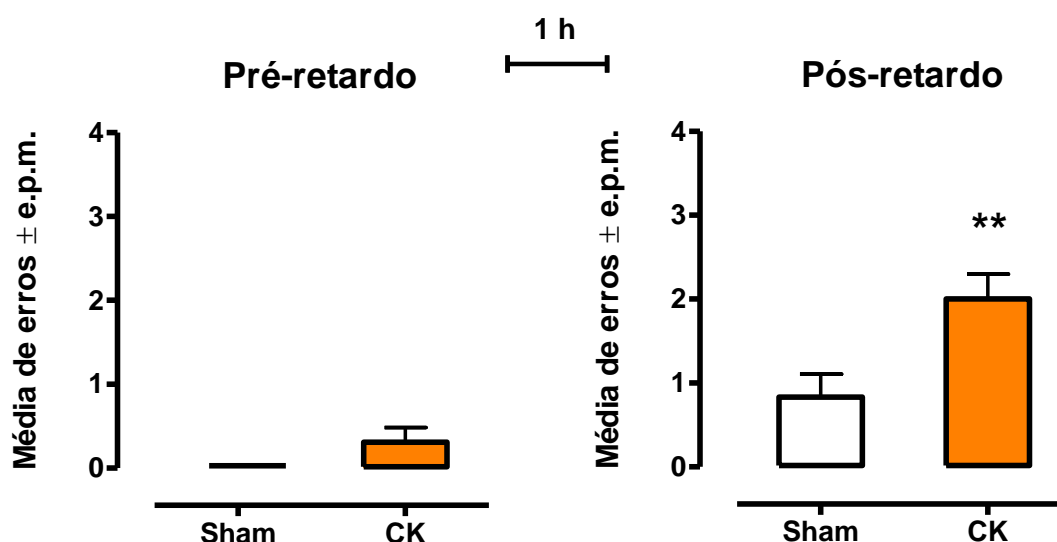


Figura 21. Efeito da inalação de *crack* (CK, $n = 13$) e da simulação (*sham*, $n = 12$), sobre o desempenho (média de erros \pm e.p.m.) antes (pré-retardo) e após (pós-retardo) os retardo de 1 hora de animais desempenhando tarefas no LR-8. ** $p < 0.01$ comparado ao grupo *sham* (teste t de Student)

O tempo gasto em cada braço antes e após o retardo de 1 hora está representado na Tabela 3. O teste de t de Student para amostras independentes, não identificou diferenças estatisticamente significantes entre os tempos em cada tratamento tanto no pré- quanto no pós-retardo de 1 hora.

Tabela 3. Média do tempo gasto (segundos) \pm e.p.m. em cada braço visitado pelos animais submetidos à inalação do *crack* (CK, $n = 13$) ou inalação simulada (*Sham*, $n = 12$) antes (pré-retardo) e após (pós-retardo) o retardo de 1 hora no LR-8.

Retardo 1 hora		
Tempo gasto em cada braço (média em segundos \pm e.p.m.)		
Grupos	Pré-retardo	Pós-retardo
<i>Sham</i>	26,4 \pm 9,9	14,7 \pm 3,9
CK	28,1 \pm 9,8	18,1 \pm 5,4

4.4 QUANTIFICAÇÃO DE AEME, COCAÍNA E SEUS METABÓLITOS

Imediatamente após a última sessão de inalação, os 13 animais do grupo CK foram anestesiados e amostras de sangue intracardíaco foram coletadas com o objetivo de avaliar as concentrações de AEME, cocaína e seus metabólitos. Foram analisados o sangue de todos os animais separadamente. A quantificação realizada por GC-MS mostrou $22,9 \pm 2,9$ ng/mL de AEME no sangue dos animais expostos ao *crack* (média \pm e.p.m.), mas não foi possível quantificar cocaína e seus metabólitos.

4.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

4.5.1 Determinação dos Produtos Avançados de Oxidação Proteica (AOPP)

Foram avaliados os produtos avançados de oxidação proteica (AOPP) em homogenato tecidual do CPF, HPC e EST. Os valores da concentração (média \pm e.p.m.) de AOPP nas áreas cerebrais estudadas estão apresentados na figura 22:

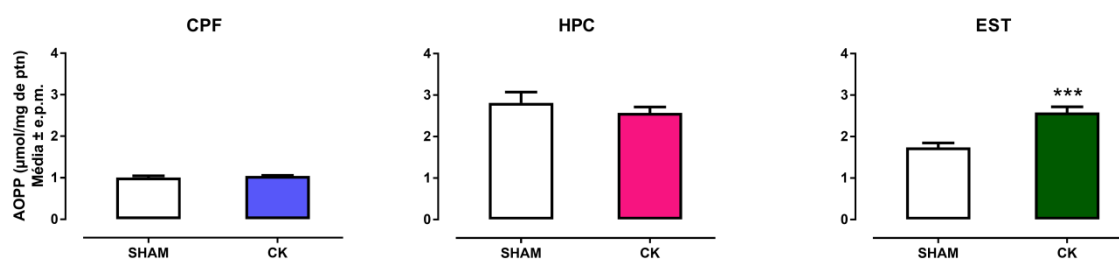


Figura 22. Efeito da inalação de *crack* sobre os níveis de produtos avançados de oxidação proteica (AOPP) no córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HPC) e estriado (EST) de ratos dos grupos *sham* e *crack* (CK) ($n = 7$ por grupo). Os dados expressos em $\mu\text{mol} / \text{mg}$ de proteína (média \pm e.p.m.). *** $p < 0,001$ comparado ao grupo *sham* (teste t de Student).

O teste t de Student para amostras independentes não identificou diferenças estatisticamente significantes no CPF e HPC entre os grupos *sham* e CK. Entretanto foram observadas diferenças estatísticas na concentração de produtos avançados

de oxidação proteica do EST. O teste demonstrou que a concentração de AOPP no EST de animais que receberam inalação direta de *crack* foi significativamente maior ($p < 0,001$) do que no grupo *sham*.

4.5.2 Ensaio de Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS)

A formação de lipoperóxidos foi analisada pela medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em homogenato tecidual do CPF, HPC e EST (Figura 23).

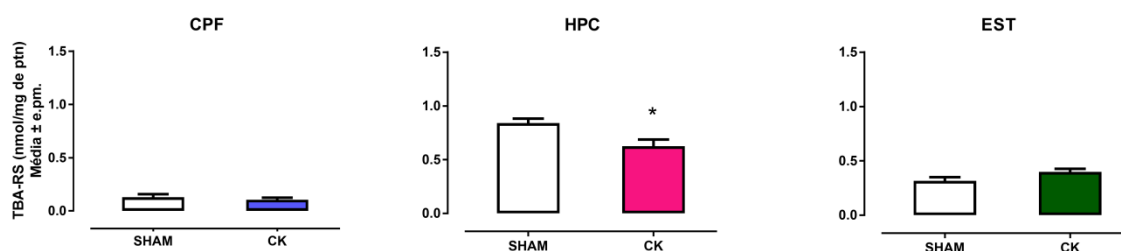


Figura 23. Efeito da inalação de *crack* sobre os níveis das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) no córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HPC) e estriado (EST) de ratos dos grupos *sham* e *crack* (CK) ($n = 7$ por grupo). Os dados expressos em nmol / mg de proteína (média \pm e.p.m.).* $p < 0,05$ comparado ao grupo *sham* (teste t de Student).

Na análise de concentração (média \pm e.p.m.) das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), foi observada que ela foi menor ($p < 0,05$) no grupo CK quando comparado ao grupo *sham* no HPC (teste t de Student para amostras independentes). Nas demais estruturas cerebrais não foram observadas nenhuma diferença significativa entre os grupos.

4.5.3 Atividade das enzimas antioxidantes: Catalase (CAT), Glutathiona Peroxidase (GPx) e Superóxido Dismutase (SOD)

A figura 24 contém as médias \pm e.p.m. da atividade das enzimas antioxidantes CAT, GPx e SOD nas regiões do CPF, HPC e EST de ratos.

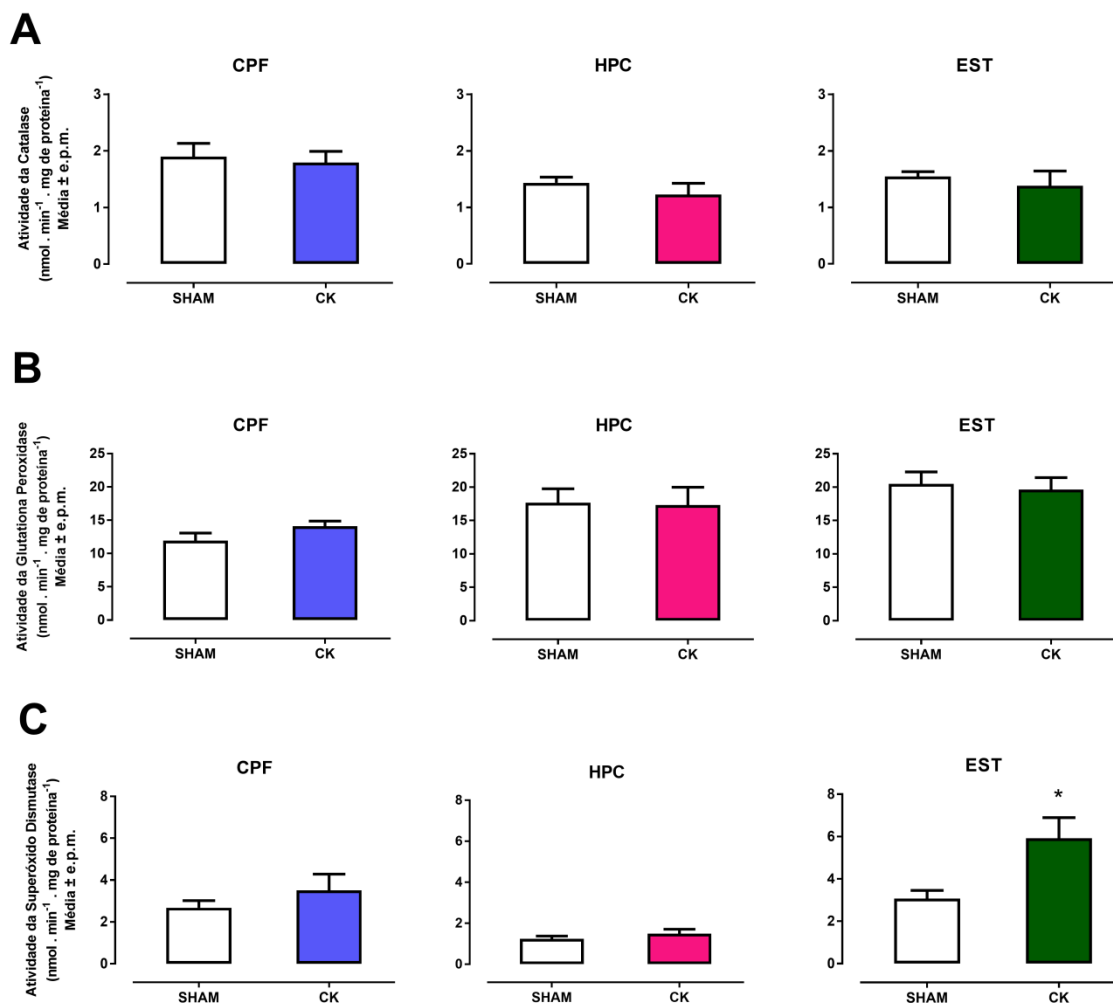


Figura 24. Atividade das enzimas (média ± e.p.m.) Catalase (A), Glutathione Peroxidase (B) e Superóxido Dismutase (C) no córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HPC) e estriado (EST) de ratos dos grupos *sham* e *crack* (CK) (n = 5-6 por grupo). Os dados expressos em nmol . min⁻¹ . mg de proteína (média ± e.p.m.). * p < 0,05 comparado ao grupo *sham* (teste *t* de Student).

Na análise da atividade das enzimas, foi observada que a atividade da enzima SOD foi maior (p < 0,05) no grupo CK quando comparado ao grupo *sham* no EST (teste *t* de Student para amostras independentes). O teste *t* de Student não detectou diferenças significantes na atividade das enzimas CAT e GPx nas áreas estudadas nos grupos CK e *sham*.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou importantes resultados em relação aos efeitos da inalação direta de *crack* em ratos. Os animais apresentaram aquisição de tarefa satisfatória no LR-8, atingindo os critérios previamente estabelecidos. No entanto, quando expostos à inalação repetida (5 dias) do *crack* (3 g/dia) houve um prejuízo significativo na memória operacional espacial de longa duração (retardo de 1 hora no LR-8), bem como alterações nos parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo. Em relação aos parâmetros bioquímicos, observamos que a exposição por cinco dias ao *crack* promoveu uma diminuição significativa nos níveis de TBA-RS no HPC. Além disso, avaliamos o dano à proteína e observamos um aumento nos níveis de AOPP e aumento da atividade da SOD no EST dos animais tratados.

Um número crescente de drogas de abuso de origem ilícita, como o caso do *crack* vem se tornando cada vez mais difundido entre a população, contribuindo com a violência e a miséria. No mundo o consumo de cocaína se manteve estável durante os últimos anos, com uma prevalência ao redor de 0,3 a 0,4% (MÉGARBANE; CHEVILLARD, 2013). No Brasil, de 2001 para 2005, resultados de levantamentos domiciliares sobre uso de drogas demonstraram que houve aumento nos relatos de uso na vida de álcool, tabaco, maconha, solventes, benzodiazepínicos, cocaína, estimulantes, esteroides, alucinógenos e *crack*; e diminuição do uso de agentes anticolinérgicos (CARLINI; GALDURÓZ, 2006).

Dados do I e do II Levantamento Domiciliar sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil, demonstraram que 0,4% (2001) e 0,9% (2005) dos entrevistados usavam cocaína em pó na região Sudeste. Essa tendência também foi verificada em outras regiões do país (CARLINI; GALDURÓZ, 2006; CARLINI et al., 2002). Além disso, o II Levantamento Nacional de Álcool e drogas revela que a prevalência do uso de *crack* nos últimos 12 meses na população adulta brasileira era de 0,7% - representando mais de 800 mil brasileiros (LARANJEIRA; MADRUGA, 2014). Outro levantamento sobre o consumo de drogas psicotrópicas entre estudantes demonstrou que 0,7% dos entrevistados usavam *crack*, e o consumo de cocaína em pó teve um aumento de 2,0 para 2,8% de 2004 para 2010 (CARLINI et al., 2010).

Infelizmente, o Brasil é o país do continente sul americano que apresenta o maior número de usuários de cocaína, aproximadamente 900 mil do total (WORLD DRUG REPORT, 2011), e este número vem apresentando um aumento, principalmente das formas mais acessíveis, como o *crack*, o qual é seis vezes mais potente e com maior potencial em causar dependência que a cocaína em pó, sendo considerada uma das drogas mais devastadoras (PIRES et al., 2012).

Sabe-se que, ao fumar o *crack*, o usuário fica exposto, além da cocaína, ao seu produto de pirólise, a AEME (WOOD et al., 1996), que é altamente neurotóxica. A partir da nossa análise pelo GC-MS foi encontrado somente a presença de AEME contrastando com os resultados de He et al., (2006). Essa diferença está relacionada principalmente com a origem da droga, visto que a droga utilizada por He et al., (2006) foi produzida no laboratório pelos próprios autores. O *crack* utilizado no presente estudo foi apreendido do tráfico de drogas pela polícia civil, ou seja, trabalhamos com uma pedra de *crack* com concentração baixa de cocaína (26%), mas que mimetiza realmente a qualidade da droga usada pelos usuários. Portanto, devido à baixa concentração de cocaína na pedra e a presença somente da AEME na análise do sangue, acreditamos que os efeitos observados na avaliação da memória operacional e nos parâmetros de estresse oxidativo possam ser mais decorrentes da ação da AEME, ainda que não possamos descartar totalmente a atuação do princípio ativo, a cocaína, embora não tenhamos detectado nas amostras sanguíneas.

Nosso estudo foi o primeiro a realizar o teste de memória operacional espacial de longa duração em ratos expostos à inalação repetida do *crack*. Todos os estudos sobre uso de *crack* e avaliação de memória encontrados na literatura são em humanos, não havendo estudos que tenham relatado este efeito sobre a memória operacional de animais no LR-8. Este paradigma comportamental tem sido sucessivamente utilizado em diferentes estudos relacionados ao uso de drogas, incluindo os realizados em nosso laboratório investigando os efeitos de outras drogas psicoativas como o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) (NAKAMURA et al., 1991; SILVA DE MELO et al., 2005), o diazepam (NAKAMURA-PALACIOS; ROELKE, 1997) e o álcool (DE OLIVEIRA; NAKAMURA-PALACIOS, 2003).

Goldman-Rakic (1995) propôs que o CPF era essencial para a memória operacional e estudos usando o LR-8 sugerem um envolvimento de regiões do CPF na memória operacional espacial (TAYLOR; LATIMER; WINN, 2003) e na organização da informação espacial recentemente adquirida (SEAMANS; FLORESCO; PHILLIPS, 1995). No entanto, a memória operacional não é executada apenas no córtex, mas emerge da interação entre áreas corticais e subcorticais (FLORESCO; SEAMANS; PHILLIPS, 1997; KOPEC et al., 2015).

Há explicações sugerindo uma interação funcional entre o CPF e HPC (FLORESCO; SEAMANS; PHILLIPS, 1997; GOTO; GRACE, 2008; YOON et al., 2008). Não é surpreendente que o HPC e o CPF sejam anatomicamente relacionados, considerando a função importante do HPC na memória. Estudos investigaram o papel do CPF e do HPC na memória operacional e observaram que a inativação de qualquer uma dessas duas estruturas reduz significativamente a precisão da memória, ou seja, a interação das duas estruturas é necessária para o desempenho da memória operacional (WANG; CAI, 2006, 2008; YOON et al., 2008).

Além do CPF e HPC, há evidências de um envolvimento do EST na aprendizagem e na memória (BONELLI; CUMMINGS, 2007; FLORESCO; SEAMANS; PHILLIPS, 1997; VOYTEK; KNIGHT, 2010). Esta estrutura parece estar envolvida especificamente com o aprendizado motor e o estabelecimento de padrões de movimentos habituais (memória de procedimentos) tal como a aquisição de respostas sequenciais, como virar à esquerda ou à direita em labirintos (MYHRER, 2003; VOYTEK; KNIGHT, 2010). Com relação às tarefas espaciais com retardos, resultados de Floresco et al., (1997) sugerem que as interações entre o CPF e o EST ventral estão envolvidas na transformação da memória espacial, processada pelos circuitos HPC-corticais, em uma sequência eficiente de respostas motoras dirigidas a objetivos.

O HPC, o CPF e o EST formam circuitos neurais interconectados que podem estar subjacentes a aspectos da cognição espacial e da memória (FLORESCO; SEAMANS; PHILLIPS, 1997). Sabendo que a atividade associativa intacta do HPC-CPF-EST é provavelmente necessária para o aprendizado e a memória em todas as

fases de treinamento no LR-8 e, levando em conta que especialmente a neurotransmissão dopaminérgica influencia os processos de memória operacional (AULTMAN; MOGHADDAM, 2001; DUNNETT; WAREHAM; TORRES, 1990; ZAHRT et al., 1997), os prejuízos da memória operacional espacial provocado pela inalação do *crack* observados em nosso estudo, poderiam ser explicados pelo fato de que, neste caso, a droga inalada pelos animais com desempenho ótimo no LR-8, prejudicou a homeostase do sistema dopaminérgico envolvido na memória operacional.

Trabalhos realizados com humanos revelam que o abuso de cocaína/*crack* está relacionado a déficits persistentes na função cognitiva com baixo desempenho nas funções executivas, nos testes de atenção, memória verbal e visual, aprendizagem, e em processos de controle e integração destinados à execução de um comportamento. O substrato neuroanatômico associado com estes comportamentos é, provavelmente, o CPF (BOLLA; ROTHMAN; CADET, 1999; CUNHA et al., 2004; GOLDSTEIN et al., 2004; HOFF et al., 1996; MEYER et al., 2014). Em outro estudo, foram observadas evidências de que usuários de cocaína mostram reduções de matéria cinzenta no HPC e CPF em comparação com adultos jovens saudáveis (ERSCHE et al., 2013). Sanvicente-Vieira et al., (2016) mostraram que a memória operacional de usuários jovens com dependência à cocaína/*crack*, exibiram quase o mesmo desempenho de participantes com mais de 60 anos, demonstrando um déficit na memória operacional desses indivíduos.

George et al., (2008) observaram que animais que foram submetidos a um protocolo de autoadministração de cocaína tiveram prejuízos em tarefas de memória operacional após ingestão crônica de cocaína. Além disso, os prejuízos da memória operacional foram positivamente correlacionados com uma diminuição da densidade de neurônios e oligodendrócitos (células responsáveis pela formação e manutenção das bainhas de mielina dos axônios) no CPF dorsomedial e orbitofrontal. Considerando o papel do CPF no comportamento dirigido a um objetivo, as disfunções observadas nessa estrutura podem exacerbar a perda de controle associada ao aumento do uso de drogas e facilitar a progressão para a dependência. Em outro estudo com autoadministração de cocaína em ratos, foi observado que a cocaína, além das mudanças que produz no sistema de

recompensa, se consumidas em altas doses, pode atenuar a produção e desenvolvimento de novos neurônios no HPC, e reduzir a memória operacional, o que, por sua vez, leva a uma redução no desempenho cognitivo (SUDAI et al., 2011).

Segundo Goldstein e Volkow (2011), uma hipótese para a piora no desempenho de tarefas relacionadas com o CPF, está associada a um padrão emergente de disfunção generalizada no CPF em indivíduos dependentes de substâncias psicoativas. Além disso, sabe-se que prejuízo das funções cognitivas frontais em usuários crônicos de drogas ocorre devido a uma redução na atividade dopaminérgica, incluindo regiões corticais e estriatais (VOLKOW et al., 1997).

A DA possui uma influência vital nas funções de memória operacional espacial no CPF, o qual tem uma intensa inervação dopaminérgica, com predominância de receptores do tipo D_1 , quando comparados com a presença de receptores D_2 e, que uma atividade excessiva dos receptores do tipo D_1 é prejudicial para a memória operacional (GASPAR; BLOCH; MOINE, 1995; ZAHRT et al., 1997). Brozoski et al., (1979), foi o primeiro a relatar sobre a importância da estimulação dos receptores dopaminérgicos sobre as funções de memória operacional espacial modulada pelo CPF, o qual observou que a depleção de DA na área dorsolateral do CPF em macacos prejudicava o desempenho da memória operacional espacial.

O uso crônico de cocaína parece levar à desregulação do sistema dopaminérgico (HOU et al., 2014). Embora a cocaína seja capaz de inibir a reabsorção de DA, noradrenalina e serotonina, acredita-se que seu poderoso efeito seja decorrente de suas ações no transportador de DA nos terminais neuronais, causando um aumento na concentração da DA (GOWRISHANKAR; HAHN; BLAKELY, 2014; MARTIN et al., 2011).

As concentrações excessivas de DA podem ser neurotóxicas (GANDHI et al., 2012). Acredita-se que a toxicidade da DA é devida à formação de ERO resultantes do seu metabolismo (por auto-oxidação ou por ação da monoamina-oxidase), levando ao estresse oxidativo (BANERJEE et al., 2014) e posteriormente a apoptose. A monoamina-oxidase catalisa a conversão de DA em Ácido 3,4-di-hidroxifenilacético

(DOPAC) e H_2O_2 , os quais podem reagir com íons de metais de transição, e assim obter o radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) altamente tóxico (CAUDLE et al., 2007; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ et al., 2004). Por outro lado, a auto-oxidação da DA pode ocorrer no meio extracelular, levando à geração de O^{2-} e quinonas tóxicas (BANERJEE et al., 2014). Ainda, o O^{2-} reage com o óxido nítrico, um produto da oxidação da arginina pela sintase do óxido nítrico neuronal, formando o ONOO^- altamente tóxico (CADET; BRANNOCK, 1998). Estudos mostraram que essa depuração da DA causa estresse celular e danos às células do cérebro (HASTINGS, 1995; HERMIDA-AMEIJEIRAS et al., 2004; HUANG et al., 2009). Além disso, existem estudos que relacionam prejuízos de aprendizagem e memória ao estresse oxidativo no sistema nervoso central (BASHKATOVA et al., 2005; GÖNENÇ et al., 2005; POMIERNY-CHAMIOŁO et al., 2013; SUDAI et al., 2011).

A cocaína promove o estresse oxidativo em áreas específicas intimamente envolvidas nos circuitos de dependência como NAc, CPF, HPC e EST causando prejuízos na aprendizagem e memória (JANG et al., 2015; MACÊDO et al., 2010; MURIACH et al., 2010). Macêdo et al., (2010) constataram que administração de altas doses de cocaína levou a dano oxidativo e morte neuronal e concluíram que este dano pode estar envolvido com aumento de ERO em áreas relacionadas aos efeitos da cocaína no cérebro. Além desses citados, outros estudos destacam que a cocaína produz estresse oxidativo no sistema nervoso central (DIETRICH et al., 2005; FINESCHI et al., 2001; GÖNENÇ et al., 2005). Entretanto, pouco se sabe sobre o uso do *crack*, visto que o produto da pirólise da cocaína, a AEME, chama atenção devido à sua neurotoxicidade. Garcia et al., (2012) demonstrou, por meio de ensaios de viabilidade celular utilizando cultura de células hipocâmpais de ratos, que a AEME apresenta maior potencial neurotóxico do que a própria cocaína. Nosso estudo é o primeiro a avaliar parâmetros de estresse oxidativo em áreas cerebrais de roedores após inalação direta de *crack*.

O presente estudo centrou-se na avaliação da peroxidação lipídica, danos a proteínas e nos mecanismos de defesa antioxidante. A exposição por cinco dias a 3 g de *crack* produziu alterações significativas no estado oxidativo. O ensaio de TBA-RS, utilizado para avaliar a peroxidação lipídica, mostrou uma diminuição significativa nos níveis de TBA-RS no HPC. Visto que esses animais apresentaram

prejuízos na memória operacional e sabendo que o CPF recebe inervação direta do HPC e o desempenho em tarefas espaciais de memória operacional é geralmente acometido após lesões dessa área (WANG; CAI, 2006, 2008; YOON et al., 2008), essa diminuição dos níveis de TBA-RS é possivelmente um indicativo de recuperação cerebral, ou seja, uma resposta do cérebro para se recuperar do estresse oxidativo que possivelmente causou um comprometimento da conectividade entre o CPF e o HPC levando ao prejuízo da memória observada no grupo CK.

Resultado semelhante foi encontrado por outro estudo, conduzido por Pomierny-Chamioło et al., (2013), que demonstraram que ratos submetidos a sessões de autoadministração de cocaína também tiveram níveis diminuídos de TBA-RS no HPC. O mesmo observou um aumento da atividade da SOD nessa área e atribuiu esses níveis diminuídos de TBA-RS a uma resposta adaptativa do sistema de defesa antioxidante, o que não pôde ser observado com nosso protocolo de inalação de *crack*. Em estudo com usuários de *crack* foi encontrado uma correlação inversa entre os níveis de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e TBA-RS no sangue (SORDI et al., 2014). Sordi et al., (2014), concluíram que, enquanto os níveis de BDNF aumentam no cérebro desses indivíduos, o nível de TBA-RS diminui, o que seria capaz de representar que usuários poderiam superar o estresse oxidativo e melhorar a plasticidade cerebral.

Ainda, avaliamos o dano à proteína através da mensuração dos produtos avançados de oxidação proteica, que são formados durante o estresse oxidativo pela reação de proteínas plasmáticas com oxidantes clorados, e observamos um aumento de AOPP no EST dos animais tratados. Esse resultado mostra um dano proteico mediado por oxidação. Esse quadro de oxidação proteica no EST pode estar envolvido nas alterações da memória operacional espacial nos animais, observado pelo teste no LR-8, uma vez que o EST recebe intensa inervação dopaminérgica (GRUETER; ROTHWELL; MALENKA, 2012), sendo, portanto, possivelmente mais suscetível a auto-oxidação da DA que causa aumento de ERO e danos as células.

Dados mostram que a locomoção exploratória dirigida a um objetivo que não é dependente do conhecimento previamente adquirido sobre a localização dos

alimentos, é facilitado por uma rede subcortical ligando o HPC ao EST ventral (FLORESCO; SEAMANS; PHILLIPS, 1997). Essa conexão entre HPC e EST pode ter sido prejudicada visto que, observamos estresse oxidativo nessas áreas cerebrais envolvidas na memória operacional. Ao mesmo tempo ocorreu um aumento da atividade da SOD no EST, enzima considerada a primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo e responsável por eliminar os ânions O^{2-} . (DIETRICH et al., 2005), comprovando que houve um aumento de ERO nessa estrutura.

Nossos resultados mostraram que não houve aumento significativo da atividade das enzimas antioxidantes CAT e GPx, e também não observamos diferenças de AOPP no HPC e CPF, e nos níveis de TBA-RS no EST e CPF. Vale ressaltar que a pedra de *crack* utilizada no presente trabalho apresentava baixa concentração de cocaína (26%) comparada a usada em outros trabalhos (AREAL et al., 2015; HE; LIDOW; LIDOW, 2006; HUEZA et al., 2016). Porém, isso retrata a qualidade da droga que tem circulado no Brasil, a qual pode ter sofrido alterações físicas e químicas, consequente da adição de diluentes, levando a preparações impuras, que podem resultar em mudança na cor, consistência, tamanho e efeitos da droga (OLIVEIRA; NAPPO, 2008). Outro fator importante a ser destacado é em relação ao esquema de administração. No presente trabalho os animais foram expostos a 3 g de *crack* uma vez ao dia ao longo de cinco dias, porém um estudo realizado por Guimarães et al., (2008) constatou que a realidade de consumo por humanos, é em média de 11,57 pedras de *crack* por dia em várias tomadas, ou seja, em uma frequência e quantidade proporcionalmente maiores. Esse foi um dos principais limitadores do nosso estudo, uma vez que tivemos acesso a uma única pedra de *crack*, e por isso ficamos restritos a usar apenas uma dose de 3 g/dia por um curto período (5 dias). Por outro lado, independente do tempo de inalação e com um valor quatro vezes menor de consumo comparado com humanos, conseguimos observar prejuízos na memória e alterações bioquímicas.

Em resumo, analisando em conjunto os dados obtidos na avaliação da memória operacional e as informações encontradas na literatura, podemos inferir que após cinco dias de inalação diária de *crack* os ratos apresentaram um prejuízo na memória operacional espacial de duração prolongada, demonstrando que o

consumo de crack altera de maneira significativa a função cognitiva de usuários da droga. Frente aos resultados observados é possível que o quadro de estresse oxidativo observado no HPC e EST possa estar envolvido nas alterações da memória operacional espacial. Além disso, tanto os efeitos comportamentais quanto as alterações bioquímicas provavelmente foram mediados pela AEME e a cocaína em conjunto. Esses resultados reforçam que a dependência ao crack não pode ser tratada da mesma forma que a dependência à cocaína em pó.

No entanto, são escassas as pesquisas sobre o *crack* e existem, ainda, muitas questões não respondidas a respeito da sua neurotoxicidade. Portanto, pesquisas futuras utilizando, por exemplo, testes de neuroinflamação são necessárias para compreender melhor sobre a neurotoxicidade dessa droga.

6 CONCLUSÕES

- Após cinco dias de inalação diária de 3 g de *crack* os ratos apresentaram um prejuízo na memória operacional espacial de duração prolongada, demonstrando que o consumo de *crack* altera de maneira significativa a função cognitiva de usuários da droga.
- No HPC, a inalação induziu uma diminuição significativa nos níveis de TBA-RS, sendo um indicativo de recuperação cerebral, ou seja, uma resposta do cérebro para se recuperar do estresse oxidativo que possivelmente causou um dano nessa via levando ao prejuízo da memória observada no grupo CK.
- No EST, observamos um aumento de AOPP nos animais tratados, sugerindo que a depuração da DA pela auto-oxidação pode estar causando, mais intensamente no EST, um dano oxidativo nas proteínas, o que não pôde ser observado nas outras áreas. Ao mesmo tempo ocorreu um aumento da atividade da SOD no EST, comprovando que houve um aumento de ERO nessa estrutura.
- Frente aos resultados observados é possível que o quadro de estresse oxidativo observado no HPC e EST possa estar envolvido nas alterações da memória operacional espacial.
- Não houve aumento significativo da atividade das enzimas antioxidantes CAT e GPx, e também não observamos diferenças de AOPP no HPC e CPF, e TBA-RS no EST e CPF, supostamente devido à baixa concentração de cocaína na pedra de *crack* utilizada no presente trabalho.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in enzymology**, v. 105, p. 121–6, 1984.
- AREAL, L. B. et al. Behavioural, biochemical and molecular changes induced by chronic crack-cocaine inhalation in mice: The role of dopaminergic and endocannabinoid systems in the prefrontal cortex. **Behavioural brain research**, v. 290, p. 8–16, 1 set. 2015.
- AULTMAN, J. M.; MOGHADDAM, B. Distinct contributions of glutamate and dopamine receptors to temporal aspects of rodent working memory using a clinically relevant task. **Psychopharmacology**, v. 153, n. 3, p. 353–64, jan. 2001.
- BADDELEY, A.; LOGIE, R. Working memory: the multiplecomponent model. In: MIYAKE, A.; SHAH, P. (Eds.). . **Models of working memory**. New York: Cambridge University Press, 1999. p. 28–105.
- BANERJEE, K. et al. Dopamine Cytotoxicity Involves Both Oxidative and Nonoxidative Pathways in SH-SY5Y Cells: Potential Role of Alpha-Synuclein Overexpression and Proteasomal Inhibition in the Etiopathogenesis of Parkinson's Disease. **Parkinson's disease**, v. 2014, p. 878935, 2014.
- BANNISTER, J. V; CALABRESE, L. Assays for superoxide dismutase. **Methods of biochemical analysis**, v. 32, p. 279–312, 1987.
- BASHKATOVA, V. et al. Memory impairments and oxidative stress in the hippocampus of in-utero cocaine-exposed rats. **Neuroreport**, v. 16, n. 11, p. 1217–21, 1 ago. 2005.
- BECHARA, A. et al. Decision-making deficits, linked to a dysfunctional ventromedial prefrontal cortex, revealed in alcohol and stimulant abusers. **Neuropsychologia**, v. 39, n. 4, p. 376–89, 2001.
- BECKER, J. T.; WALKER, J. A.; OLTON, D. S. Neuroanatomical bases of spatial memory. **Brain research**, v. 200, n. 2, p. 307–20, 3 nov. 1980.
- BELIN, D.; EVERITT, B. J. Cocaine seeking habits depend upon dopamine-dependent serial connectivity linking the ventral with the dorsal striatum. **Neuron**, v. 57, n. 3, p. 432–41, 7 fev. 2008.
- BOLLA, K. I.; ROTHMAN, R.; CADET, J. L. Dose-Related Neurobehavioral Effects of Chronic Cocaine Use. **The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 11, n. 3, p. 361–369, ago. 1999.
- BONELLI, R. M.; CUMMINGS, J. L. Frontal-subcortical circuitry and behavior.

Dialogues in clinical neuroscience, v. 9, n. 2, p. 141–51, 2007.

BRITT, J. P. et al. Synaptic and behavioral profile of multiple glutamatergic inputs to the nucleus accumbens. **Neuron**, v. 76, n. 4, p. 790–803, 21 nov. 2012.

BROZOSKI, T. J. et al. Cognitive deficit caused by regional depletion of dopamine in prefrontal cortex of rhesus monkey. **Science**. New York, N.Y., v. 205, n. 4409, p. 929–32, 31 ago. 1979.

BYSTROWSKA, B. et al. Changes in endocannabinoid and N-acylethanolamine levels in rat brain structures following cocaine self-administration and extinction training. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 50, p. 1–10, 2014.

CADET, J. L.; BRANNOCK, C. Free radicals and the pathobiology of brain dopamine systems. **Neurochemistry international**, v. 32, n. 2, p. 117–31, fev. 1998.

CARLINI, A. E.; GALDURÓZ, J. C. F. **II Levantamento Domiciliar Sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil: Estudo Envolvendo as 108 Maiores Cidades do País 2005**. São Paulo: CEBRID - Centro Brasileiro de Informação sobre Drogas, Departamento de Psicobiologia - UNIFESP, 2006. v. 106

CARLINI, E. A. et al. **I Levantamento Domiciliar sobre o Uso de drogas psicotrópicas no Brasil: pesquisa domiciliar envolvendo as 107 maiores cidades do país - 2001**. São Paulo: CEBRID - Centro Brasileiro de Informação sobre Drogas, Departamento de Psicobiologia - UNIFESP, 2002.

CARLINI, E. A.; NAPPO, S. A.; NOTO, A. R. Drogas Psicotrópicas - O Que São E Como Agem. **Revista IMESC**, v. nº 3, p. 9–35, 2001.

CARLINI, E. L. DE A. et al. VI Levantamento Nacional sobre o Consumo de Drogas Psicotrópicas entre Estudantes do Ensino Fundamental e Médio das Redes Pública e Privada de Ensino nas 27 Capitais Brasileiras 2010. **CEBRID - Centro Brasileiro de Informação sobre Drogas, Departamento de Psicobiologia - UNIFESP**, 2010.

CASTAGNE, V. et al. Relationships between neuronal death and the cellular redox status. Focus on the developing nervous system. **Progress in neurobiology**, v. 59, n. 4, p. 397–423, nov. 1999.

CAUDLE, W. M. et al. Reduced vesicular storage of dopamine causes progressive nigrostriatal neurodegeneration. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 27, n. 30, p. 8138–48, 25 jul. 2007.

CHASIN, A.; SILVA, E.; CARVALHO, V. Estimulantes do Sistema Nervoso Central. In: OGA, S.; CAMARGO, M.; BATISTUZZO, J. **Fundamentos de Toxicologia**. 3. ed.

São Paulo: Ed. Atheneu, 2008. p. 353–374.

CHEN, B. T. et al. Rescuing cocaine-induced prefrontal cortex hypoactivity prevents compulsive cocaine seeking. **Nature**, v. 496, n. 7445, p. 359–62, 18 abr. 2013.

CHIRICO, S. et al. Lipid peroxidation in hyperlipidaemic patients. A study of plasma using an HPLC-based thiobarbituric acid test. **Free radical research communications**, v. 19, n. 1, p. 51–7, 1993.

CHISOLM, G. M.; STEINBERG, D. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. **Free radical biology & medicine**, v. 28, n. 12, p. 1815–26, 15 jun. 2000.

CONTI, C. **Neuromodulação do Córtex pré-frontal em usuários de crack**. [tese] UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO, 2013.

CROMBAG, H. S. et al. Context-induced relapse to drug seeking: a review. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 363, n. 1507, p. 3233–3243, 12 out. 2008.

CUNHA, P. J. et al. Neuropsychological impairments in crack cocaine-dependent inpatients: preliminary findings. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 26, n. 2, p. 103–6, jun. 2004.

DEAN, R. T. et al. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. **The Biochemical journal**, p. 1–18, 15 maio 1997.

DE OLIVEIRA, R. W. D.; NAKAMURA-PALACIOS, E. M. Haloperidol increases the disruptive effect of alcohol on spatial working memory in rats: a dopaminergic modulation in the medial prefrontal cortex. **Psychopharmacology**, v. 170, n. 1, p. 51–61, 29 out. 2003.

DI CHIARA, G. et al. Dopamine and drug addiction: the nucleus accumbens shell connection. **Neuropharmacology**, v. 47 Suppl 1, p. 227–41, jan. 2004.

DIETRICH, J.-B. et al. Acute or repeated cocaine administration generates reactive oxygen species and induces antioxidant enzyme activity in dopaminergic rat brain structures. **Neuropharmacology**, v. 48, n. 7, p. 965–974, jun. 2005.

DILEONE, R. J.; TAYLOR, J. R.; PICCIOTTO, M. R. The drive to eat: comparisons and distinctions between mechanisms of food reward and drug addiction. **Nature neuroscience**, v. 15, n. 10, p. 1330–5, 25 out. 2012.

DRECHSEL, D. A.; PATEL, M. Differential contribution of the mitochondrial respiratory chain complexes to reactive oxygen species production by redox cycling agents implicated in parkinsonism. **Toxicological Sciences: an official journal of**

the Society of Toxicology, v. 112, n. 2, p. 427–34, 1 dez. 2009.

DRÖGE, W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. **Physiological Reviews**, v. 82, n. 1, p. 47–95, 1 jan. 2002.

DUNN, J. et al. Crack cocaine: an increase in use among patients attending clinics in São Paulo: 1990-1993. **Substance use & misuse**, v. 31, n. 4, p. 519–27, mar. 1996.

DUNNETT, S. B.; WAREHAM, A. T.; TORRES, E. M. Cholinergic blockade in prefrontal cortex and hippocampus disrupts short-term memory in rats. **Neuroreport**, v. 1, n. 1, p. 61–4, set. 1990.

ENGLAND, T. G. et al. Determination of oxidative DNA base damage by gas chromatography-mass spectrometry. Effect of derivatization conditions on artifactual formation of certain base oxidation products. **Free radical research**, v. 29, n. 4, p. 321–30, out. 1998.

ERSCHE, K. D. et al. Cocaine dependence: a fast-track for brain ageing? **Molecular psychiatry**, v. 18, n. 2, p. 134–5, 24 fev. 2013.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in enzymology**, v. 186, p. 407–21, 1990.

FANG, Y.-Z.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition** Burbank, Los Angeles County, Calif., v. 18, n. 10, p. 872–9, out. 2002.

FINESCHI, V. et al. Markers of cardiac oxidative stress and altered morphology after intraperitoneal cocaine injection in a rat model. **International journal of legal medicine**, v. 114, n. 6, p. 323–30, 2001.

FLORESCO, S. B.; SEAMANS, J. K.; PHILLIPS, A. G. Selective roles for hippocampal, prefrontal cortical, and ventral striatal circuits in radial-arm maze tasks with or without a delay. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 17, n. 5, p. 1880–90, 1 mar. 1997.

FOWLER, J. S. et al. Imaging the addicted human brain. **Science & practice perspectives**, v. 3, n. 2, p. 4–16, abr. 2007.

FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. **The Journal of experimental biology**, v. 201, n. Pt 8, p. 1203–9, abr. 1998.

FUSTER, J. M. Frontal lobe and cognitive development. **Journal of neurocytology**, v. 31, n. 3–5, p. 373–85, 2002.

GAGLIARDO, A.; MAZZOTTO, M.; DIVAC, I. Memory of radial maze behavior in pigeons after ablations of the presumed equivalent of mammalian prefrontal cortex.

Behavioral neuroscience, v. 111, n. 5, p. 955–62, out. 1997.

GANDHI, S. et al. Dopamine induced neurodegeneration in a PINK1 model of Parkinson's disease. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e37564, 25 maio 2012.

GARCIA, R. C. T. **Efeitos neurodegenerativos da metilecgonidina e da cocaína em cultura celular primária de hipocampo**. [dissertação] UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 2009.

GARCIA, R. C. T. et al. Neurotoxicity of Anhydroecgonine Methyl Ester, a Crack Cocaine Pyrolysis Product. **Toxicological Sciences**, v. 128, n. 1, p. 223–234, 1 jul. 2012.

GARCIA, R. C. T. **Envolvimento da metilecgonidina, produto de pirólise da cocaína, na farmacodependência**. [tese] UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 2014.

GASPAR, P.; BLOCH, B.; MOINE, C. D1 and D2 Receptor Gene Expression in the Rat Frontal Cortex: Cellular Localization in Different Classes of Efferent Neurons. **European Journal of Neuroscience**, v. 7, n. 5, p. 1050–1063, maio 1995.

GEDDES, J. W. et al. Comparison of neuropathologic criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease. **Neurobiology of aging**, v. 18, n. 4 Suppl, p. S99-105, 1997.

GEORGE, O. et al. Extended Access to Cocaine Self-Administration Produces Long-Lasting Prefrontal Cortex-Dependent Working Memory Impairments. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 10, p. 2474–2482, 21 set. 2008.

GOLDMAN-RAKIC, P. S. Cellular basis of working memory. **Neuron**, v. 14, n. 3, p. 477–85, mar. 1995.

GOLDSTEIN, R. Z. et al. Severity of neuropsychological impairment in cocaine and alcohol addiction: association with metabolism in the prefrontal cortex. **Neuropsychologia**, v. 42, n. 11, p. 1447–58, jan. 2004.

GOLDSTEIN, R. Z.; VOLKOW, N. D. Drug addiction and its underlying neurobiological basis: neuroimaging evidence for the involvement of the frontal cortex. **The American journal of psychiatry**, v. 159, n. 10, p. 1642–52, out. 2002.

GOLDSTEIN, R. Z.; VOLKOW, N. D. Dysfunction of the prefrontal cortex in addiction: neuroimaging findings and clinical implications. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 12, n. 11, p. 652–69, 20 out. 2011.

GÖNENÇ, S. et al. Effects of melatonin on oxidative stress and spatial memory impairment induced by acute ethanol treatment in rats. **Physiological research**, v. 54, n. 3, p. 341–8, 2005.

GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, T. et al. Expression of dopamine and vesicular

monoamine transporters and differential vulnerability of mesostriatal dopaminergic neurons. **The Journal of comparative neurology**, v. 479, n. 2, p. 198–215, 8 nov. 2004.

GOTO, Y.; GRACE, A. A. Dopamine modulation of hippocampal-prefrontal cortical interaction drives memory-guided behavior. **Cerebral cortex (New York, N.Y.: 1991)**, v. 18, n. 6, p. 1407–14, 1 jun. 2008.

GOWRISHANKAR, R.; HAHN, M. K.; BLAKELY, R. D. Good riddance to dopamine: Roles for the dopamine transporter in synaptic function and dopamine-associated brain disorders. **Neurochemistry International**, v. 73, p. 42–48, jul. 2014.

GRUETER, B. A.; ROTHWELL, P. E.; MALENKA, R. C. Integrating synaptic plasticity and striatal circuit function in addiction. **Current opinion in neurobiology**, v. 22, n. 3, p. 545–51, jun. 2012.

GUIMARÃES, C. F. et al. Perfil do usuário de crack e fatores relacionados à criminalidade em unidade de internação para desintoxicação no Hospital Psiquiátrico São Pedro de Porto Alegre (RS). **Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul**, v. 30, n. 2, p. 101–108, ago. 2008.

HABER, S. N.; FUDGE, J. L.; MCFARLAND, N. R. Striatonigrostriatal pathways in primates form an ascending spiral from the shell to the dorsolateral striatum. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 20, n. 6, p. 2369–82, 15 mar. 2000.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **Journal of neurochemistry**, v. 59, n. 5, p. 1609–23, nov. 1992.

HALLIWELL, B. Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward? **Cardiovascular research**, v. 47, n. 3, p. 410–8, 18 ago. 2000.

HALLIWELL, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. **Drugs & aging**, v. 18, n. 9, p. 685–716, 2001.

HALLIWELL, B.; GROOTVELD, M.; GUTTERIDGE, J. M. Methods for the measurement of hydroxyl radicals in biomedical systems: deoxyribose degradation and aromatic hydroxylation. **Methods of biochemical analysis**, v. 33, p. 59–90, 1988.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British journal of pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 231–55, maio 2004.

- HASTINGS, T. G. Enzymatic oxidation of dopamine: the role of prostaglandin H synthase. **Journal of neurochemistry**, v. 64, n. 2, p. 919–24, fev. 1995.
- HE, F.; LIDOW, I. A.; LIDOW, M. S. Inhalational model of cocaine exposure in mice: Neuroteratological effects. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 28, n. 2, p. 181–197, mar. 2006.
- HERMIDA-AMEIJEIRAS, A. et al. Autoxidation and MAO-mediated metabolism of dopamine as a potential cause of oxidative stress: role of ferrous and ferric ions. **Neurochemistry international**, v. 45, n. 1, p. 103–16, jul. 2004.
- HOFF, A. L. et al. Effects of crack cocaine on neurocognitive function. **Psychiatry research**, v. 60, n. 2–3, p. 167–76, 29 mar. 1996.
- HOU, H. et al. Brain dopaminergic system changes in drug addiction: a review of positron emission tomography findings. **Neuroscience Bulletin**, v. 30, n. 5, p. 765–776, 28 out. 2014.
- HUANG, M.-C. et al. Alterations in oxidative stress status during early alcohol withdrawal in alcoholic patients. **Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi**, v. 108, n. 7, p. 560–9, jul. 2009.
- HUEZA, I. M. et al. A new exposure model to evaluate smoked illicit drugs in rodents: A study of crack cocaine. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 77, p. 17–23, jan. 2016.
- HYMAN, S. E.; MALENKA, R. C. Addiction and the brain: The neurobiology of compulsion and its persistence. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, n. 10, p. 695–703, out. 2001.
- IZQUIERDO, I. Memórias. **Estudos Avançados**, v. 3, n. 6, p. 89–112, 1989.
- JANG, E. Y. et al. Involvement of reactive oxygen species in cocaine-taking behaviors in rats. **Addiction biology**, v. 20, n. 4, p. 663–75, jul. 2015.
- JENNER, P.; OLANOW, C. W. Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. **Neurology**, v. 47, n. 6 Suppl 3, p. S161-70, dez. 1996.
- JOFFE, M. E.; GRUETER, C. A.; GRUETER, B. A. Biological substrates of addiction. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Cognitive Science**, v. 5, n. 2, p. 151–171, mar. 2014.
- KALOUSOVÁ, M.; SKRHA, J.; ZIMA, T. Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus. **Physiological research**, v. 51, n. 6, p. 597–604, 2002.
- KESSLER, F.; PECHANSKY, F. Uma visão psiquiátrica sobre o fenômeno do crack

na atualidade. **Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul**, v. 30, n. 2, p. 96–98, 2008.

KOPEC, C. D. et al. Cortical and Subcortical Contributions to Short-Term Memory for Orienting Movements. **Neuron**, v. 88, n. 2, p. 367–377, 21 out. 2015.

LARANJEIRA, R.; MADRUGA, C. S. **II Levantamento Nacional de Álcool Drogas (LENAD) - 2012**. São Paulo: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas de Álcool e Outras Drogas (INPAD), 2014.

LOBO, V. et al. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy Reviews**, v. 4, n. 8, p. 118, jul. 2010.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–75, nov. 1951.

LÜ, J.-M. et al. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 14, n. 4, p. 840–860, abr. 2010.

MACÊDO, D. S. et al. Cocaine-induced status epilepticus and death generate oxidative stress in prefrontal cortex and striatum of mice. **Neurochemistry international**, v. 56, n. 1, p. 183–7, jan. 2010.

MARTIN, B. J. et al. Dopamine transporter inhibition is necessary for cocaine-induced increases in dendritic spine density in the nucleus accumbens. **Synapse**, v. 65, n. 6, p. 490–496, jun. 2011.

MATÉS, J. M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, v. 153, n. 1–3, p. 83–104, 16 nov. 2000.

MÉGARBANE, B.; CHEVILLARD, L. The large spectrum of pulmonary complications following illicit drug use: Features and mechanisms. **Chemico-Biological Interactions**, v. 206, n. 3, p. 444–451, 5 dez. 2013.

MEYER, V. J. et al. Crack cocaine use impairs anterior cingulate and prefrontal cortex function in women with HIV infection. **Journal of neurovirology**, v. 20, n. 4, p. 352–61, 24 ago. 2014.

MISHKIN, .M.; PETRI, H. L. Memories and habits: some implications for the analysis of learning retention. In: SQUIRE, L.; BUTTERS, N. **The Neuropsychology of memory**. New York: Guilford Press, 1984. p. 287–96.

MURIACH, M. et al. Cocaine causes memory and learning impairments in rats: involvement of nuclear factor kappa B and oxidative stress, and prevention by topiramate. **Journal of Neurochemistry**, v. 114, n. 3, p. 675–684, 9 jun. 2010.

- MYHRER, T. Neurotransmitter systems involved in learning and memory in the rat: a meta-analysis based on studies of four behavioral tasks. **Brain research. Brain research reviews**, v. 41, n. 2–3, p. 268–87, mar. 2003.
- NAKAMURA-PALACIOS, E. M.; ROELKE, C. E. Effects of acute daily administration of diazepam on spatial learning and working memory. **Drug and alcohol dependence**, v. 46, n. 3, p. 181–90, 4 jul. 1997.
- NAKAMURA, E. M. et al. Reversible effects of acute and long-term administration of delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) on memory in the rat. **Drug and alcohol dependence**, v. 28, n. 2, p. 167–75, ago. 1991.
- NAPPO, S. A.; GALDURÓZ, J. C. F.; NOTO, A. R. Uso do “crack” em São Paulo: fenômeno emergente? [Crack use in Sao Paulo city: an emergent phenomenon?]. **Rev. ABP-APAL**, v. 16, n. 2, p. 75–83, 1994.
- NARVAEZ, J. C. M. et al. Peripheral toxicity in crack cocaine use disorders. **Neuroscience Letters**, v. 544, p. 80–84, 7 jun. 2013.
- NESTLER, E. J.; LANDSMAN, D. Learning about addiction from the genome. **Nature**, v. 409, n. 6822, p. 834–835, 15 fev. 2001.
- NUMA, R. et al. Tempol diminishes cocaine-induced oxidative damage and attenuates the development and expression of behavioral sensitization. **Neuroscience**, v. 155, n. 3, p. 649–58, 26 ago. 2008.
- OLIVEIRA, M. G. et al. Ethanol decreases choice accuracy in a radial maze delayed test. **Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas**, v. 23, n. 6–7, p. 547–53, 1990.
- OLIVEIRA, L. G. DE; NAPPO, S. A. Characterization of the crack cocaine culture in the city of São Paulo: a controlled pattern of use. **Revista de Saúde Pública**, v. 42, n. 4, p. 664–71, ago. 2008.
- OLTON, D. S. Mazes, maps, and memory. **The American psychologist**, v. 34, n. 7, p. 583–96, jul. 1979.
- OLTON, D. S.; SAMUELSON, R. J. Remembrance of places passed: Spatial memory in rats. **Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes**, v. 2, n. 2, p. 97–116, 1976.
- PANDEY, K. B.; RIZVI, S. I. Protective effect of resveratrol on markers of oxidative stress in human erythrocytes subjected to in vitro oxidative insult. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. S1, p. S11–S14, jan. 2010.
- PAUL, B. D. et al. Concentration profiles of cocaine, pyrolytic methyl ecgonidine and

thirteen metabolites in human blood and urine: determination by gas chromatography-mass spectrometry. **Biomedical Chromatography**, v. 19, n. 9, p. 677–688, nov. 2005.

PELICAO, F. S. et al. A One-Step Extraction Procedure for the Screening of Cocaine, Amphetamines and Cannabinoids in Postmortem Blood Samples. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 38, n. 6, p. 341–348, 1 jul. 2014.

PIRES, A. et al. Repeated inhalation of crack-cocaine affects spermatogenesis in young and adult mice. **Inhalation Toxicology**, v. 24, n. 7, p. 439–446, 30 jun. 2012.

PIWOWAR, A.; KNAPIK-KORDECKA, M.; WARWAS, M. AOPP and its relations with selected markers of oxidative/antioxidative system in type 2 diabetes mellitus. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 77, n. 2, p. 188–192, ago. 2007.

POMIERNY-CHAMIOŁO, L. et al. Oxidative stress biomarkers in some rat brain structures and peripheral organs underwent cocaine. **Neurotoxicity research**, v. 23, n. 1, p. 92–102, 12 jan. 2013.

RIBEIRO, L. A.; SANCHEZ, Z. M.; NAPPO, S. A. Surviving crack: a qualitative study of the strategies and tactics developed by Brazilian users to deal with the risks associated with the drug. **BMC public health**, v. 10, n. 1, p. 671, 4 nov. 2010.

RITZ, M. C.; CONE, E. J.; KUCHAR, M. J. Cocaine inhibition of ligand binding at dopamine, norepinephrine and serotonin transporters: a structure-activity study. **Life sciences**, v. 46, n. 9, p. 635–45, 1990.

ROSSA, A. A. O Sistema de Recompensa do Cérebro humano. **Revista Textual**, p. 4–11, 2012.

RUSSO, S. J.; NESTLER, E. J. The Brain Reward Circuitry in Mood Disorders. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 14, n. 9, p. 1–34, 2014.

SAINT-CYR, J. A. Frontal-striatal circuit functions: context, sequence, and consequence. **Journal of the International Neuropsychological Society**, v. 9, n. 1, p. 103–27, jan. 2003.

SANTOS, J. DOS. **O Crack: o grande mal do século XXI**. [monografia] Universidade Estácio de Sá de Santa Catarina, 2011.

SANVICENTE-VIEIRA, B. et al. Crack-cocaine dependence and aging: effects on working memory. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 38, n. 1, p. 58–60, mar. 2016.

SEAMANS, J. K.; FLORESCO, S. B.; PHILLIPS, A. G. Functional differences between the prelimbic and anterior cingulate regions of the rat prefrontal cortex.

Behavioral neuroscience, v. 109, n. 6, p. 1063–73, dez. 1995.

SILVA DE MELO, L. C. et al. Delta(9)-THC administered into the medial prefrontal cortex disrupts the spatial working memory. **Psychopharmacology**, v. 183, n. 1, p. 54–64, 15 nov. 2005.

SORDI, A. O. et al. Oxidative stress and BDNF as possible markers for the severity of crack cocaine use in early withdrawal. **Psychopharmacology**, v. 231, n. 20, p. 4031–9, 28 out. 2014.

SUDAI, E. et al. High cocaine dosage decreases neurogenesis in the hippocampus and impairs working memory. **Addiction Biology**, v. 16, n. 2, p. 251–260, abr. 2011.

SULZER, D. et al. Mechanisms of neurotransmitter release by amphetamines: A review. **Progress in Neurobiology**, v. 75, n. 6, p. 406–433, abr. 2005.

TAYLOR, C. L.; LATIMER, M. P.; WINN, P. Impaired delayed spatial win-shift behaviour on the eight arm radial maze following excitotoxic lesions of the medial prefrontal cortex in the rat. **Behavioural brain research**, v. 147, n. 1–2, p. 107–14, 17 dez. 2003.

TOENNES, S. W. et al. Artifact production in the assay of anhydroecgonine methyl ester in serum using gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 792, n. 2, p. 345–51, 25 jul. 2003.

URSO, M. L.; CLARKSON, P. M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology**, v. 189, n. 1–2, p. 41–54, 15 jul. 2003.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323–1338, out. 2007.

VOLKOW, N. D. et al. Relationship between subjective effects of cocaine and dopamine transporter occupancy. **Nature**, v. 386, n. 6627, p. 827–30, 24 abr. 1997.

VOYTEK, B.; KNIGHT, R. T. Prefrontal cortex and basal ganglia contributions to visual working memory. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 42, p. 18167–72, 19 out. 2010.

WANG, G.-W.; CAI, J.-X. Disconnection of the hippocampal-prefrontal cortical circuits impairs spatial working memory performance in rats. **Behavioural brain research**, v. 175, n. 2, p. 329–36, 15 dez. 2006.

WANG, G.-W.; CAI, J.-X. Reversible disconnection of the hippocampal-prelimbic

cortical circuit impairs spatial learning but not passive avoidance learning in rats.

Neurobiology of learning and memory, v. 90, n. 2, p. 365–73, set. 2008.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods in enzymology**, v. 77, p. 325–33, 1981.

WITKO-SARSAT, V. et al. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. **Journal of immunology**, v. 161, n. 5, p. 2524–32, 1 set. 1998.

WOOD, R. W. et al. Methylecgonidine coats the crack particle. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 53, n. 1, p. 57–66, jan. 1996.

WORLD DRUG REPORT. **United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC)**. Disponível em: <<http://www.unodc.org>>.

YANAGIDA, T. et al. Oxidative stress induction of DJ-1 protein in reactive astrocytes scavenges free radicals and reduces cell injury. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2, n. 1, p. 36–42, 2009.

YELNIK, J. Modeling the organization of the basal ganglia. **Revue Neurologique**, v. 164, n. 12, p. 969–976, dez. 2008.

YOON, T. et al. Prefrontal cortex and hippocampus subserve different components of working memory in rats. **Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 15, n. 3, p. 97–105, mar. 2008.

YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological reviews**, v. 74, n. 1, p. 139–62, jan. 1994.

ZAHRT, J. et al. Supranormal stimulation of D1 dopamine receptors in the rodent prefrontal cortex impairs spatial working memory performance. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 17, n. 21, p. 8528–35, 1 nov. 1997.

ZAPARTE, A. et al. Early abstinence of crack-cocaine is effective to attenuate oxidative stress and to improve antioxidant defences. **Psychopharmacology**, v. 232, n. 8, p. 1405–13, 23 abr. 2015.